

PLANT CELL DEATH SYSTEM

Publication number: WO0233106

Publication date: 2002-04-25

Inventor: THOMAS CHRISTOPHER JOHN ROBERT;
MCPHERSON MICHAEL JOHN; ATKINSON HOWARD
JOHN; NEELAM ANIL

Applicant: CAMBRIDGE ADVANCED TECH (GB)

Classification:





- international: **A01H5/00; C07K14/415; C12N15/82; A01H5/00;
C07K14/415; C12N15/82; (IPC1-7): C12N15/82**

- European: C07K14/415; C12N15/82C8B6D; C12N15/82C8D2

Application number: WO2001GB04581 20011015






Priority number(s): GB20000025225 20001014

Also published as:

 WO0233106 (A3)
 US2007107079 (A1)
 US2002138869 (A1)
 US2002116737 (A1)
 RU2004127975 (A)

more >>

Cited documents:

 US5332808
 EP0466222
 WO9417194
 WO8910396
 XP002198695

Report a data error here

Abstract of WO0233106

This invention seeks to provide means by which transgenic plants harbour within their genome a chimaeric gene which when expressed produces a protein having a cytotoxic effect. Cytotoxicity is achieved by way of a protein or part thereof capable of blocking cellular protein synthesis, such as a maize ribosome inactivating protein or part thereof. The chimaeric gene may comprise a promoter operably linked to a sequence encoding a protein capable of blocking cellular protein synthesis such that the promoter is inducible at and/or adjacent to a target site.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Documentos completos

 Nueva
búsqueda

 Reformular
la pregunta

 Documento
previo

Documento
siguiente 

 Lista de las
respuestas

 Página
inicio B.D.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Documento 2

Clasif.Principal C12N005/14

Título METODO QUE GENERA CITOTOXICIDAD EN PLANTAS Y QUE COMPRENDE LA TRANSFORMACION GENETICA CON ADNS QUIMERICOS RECOMBINANTES QUE CONTIENEN CADA UNO, UN PROMOTOR ESPECIFICO DE UN TEJIDO Y UNA SECUENCIA DE ADN CODIFICANTE DE PROTEINA DESACTIVADORA DE RIBOSOMAS (RIP) DE MAIZ, O PARTE DE ELLA, Y CUYA EXPRESION LA REGULA DICHO PROMOTOR.

NºPublic. 200102458

NºSolicitud CLP200102458

F.Solicitud 20011011

F.Pub.Con. 20021128

Solicitante ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LIMITED

Dirección GLOBE HOUSE, 1 WATER STREET WC2 3LA LONDON

Nación Resid. GB

Inventores THOMAS CHRISTOPHER JOHN ROBERT
MCPHERSON MICHAEL JOHN
ATKINSON HOWARD JOHN
NEELAM ANIL
ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LIMITED

Prioridades GB2000101400252254

Resumen SE PROVEE UN MEDIO POR EL CUAL LAS PLANTAS CONTENGAN EN SU GENOMA UN GEN QUIMERICO QUE, CUANDO SE EXPRESA, PRODUCE UNA PROTEINA QUE TIENE UN EFECTO CITOTOXICO. LA CITOTOXIDAD SE LOGRA POR MEDIO DE UNA PROTEINA O UNA PARTE DE LA MISMA QUE TIENE LA CAPACIDAD DE BLOQUEAR LA SINTESIS DE PROTEINAS CELULAR, TAL COMO UNA PROTEINA DESACTIVADORA DE RIBOSOMAS DE MAIZ O UNA PARTE DE LA MISMA. EL GEN QUIMERICO PUEDE COMPRENDER UN PROMOTOR LIGANDO OPERATIVAMENTE A UNA SECUENCIA QUE CODIFICA UNA PROTEINA CAPAZ DE BLOQUEAR LA SINTESIS DE PROTEINAS CELULAR DE MODO QUE EL PROMOTOR ES INDUCIBLE EN Y/O ADYACENTE A UN SITIO BLANCO.

Cod. Publ. A

Petición de búsqueda : ((Advanced Technologies):INVE,SOLI)

Ayuda

A-3474

RD/TL/RD-ATC-28

Porzio, Ríos & Asociados

(P. 4219 Noetinger)

22 FECHA DE SOLICITUD

DIA MES AÑO

41

DIA MES AÑO

12

TIPO DE SOLICITUD

- ☒ PATENTE DE INVENCIÓN
☐ PATENTE DE PRECAUCIONAL
☐ MODELO DE UTILIDAD
☐ DISEÑO INDUSTRIAL
☐ TRANSFERENCIA
☐ CAMBIO DE NOMBRE
☐ LICENCIA

PRIORIDAD:
TIPO

- ☒ PATENTE DE INVENCIÓN
☐ PATENTE PRECAUCIONAL
☐ MODELO DE UTILIDAD
☐ DISEÑO INDUSTRIAL

31

N°

0025225.4

33

PAIS:

U.K.

32

FECHA:

14/10/00

ESTADO

- ☐ CONCEDIDA
☒ EN TRAMITE

DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS

- ☒ RESUMEN
☒ MEMORIA DESCRIPTIVA
☒ PLIEGO DE REIVINDICACIONES
☒ DIBUJOS
☒ PODER
☒ CESION
☒ COPIA PRIORIDAD
☒ PROTOTIPO
- ☐ CERTIFICADA
☐ TRADUCIDA AL ESPAÑOL

TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD

Sistema de muerte celular en plantas.

71

SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO)

Advanced Technologies (Cambridge) Limited

Globe House, 1 Water Street
 London, WC2R 3LA
 Inglaterra

72

INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD)

Christopher John Robert THOMAS - británico -
 Michael John McPHERSON - británico -
 Howard John ATKINSON - británico -
 Anil NEELAM - británico -

74

REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO)

Marino Porzio Bozzolo y/o Hernán Ríos de Marimón y/o
 Cristóbal Porzio Honorato y/o Rafael Covarrubias Porzio

Porzio, Ríos & Asociados

Santía Lucía No. 330, Piso 7°, SANTIAGO DE CHILE

FONO: (562)639 77 11 FAX: (562)632 67 32

e-mail: porzio@porzio.cl MAIL: P.O. Box 10.294

DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDA-
 Deros Y TAMBIEN CONOCER EL ART. 44 DE LA LEY N° 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRE-
 SENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.

RECEPCION

11.472.650-8

FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE

FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE

INSTRUCCIONES:
 1.- LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINA NO MANUSCRITO;
 2.- SE ENTENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO



(19) **REPUBLICA DE CHILE**
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:

☒ INVENCIÓN

☐ MODELO DE UTILIDAD

☐ PRECAUCIONAL

☐ MEJORA

☐ REVALIDA

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. 8:

(21) Número de Solicitud:

(22) Fecha de Solicitud **Jueves 11 de Octubre de 2001**

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

U.K. 0025225.4 14/Oct/00

(72) Nombre Inventor(es): (incluirl dirección)

Christopher John Robert THOMAS

Michael John McPIERSON

Howard John ATKINSON

Anil NEELAM

(71) Nombre Solicitante: (incluirl dirección y tel.)

Advanced Technologies (Cambridge)

Limited

Globe House, 1 Water Street

London, WC2R 3LA

Inglaterra

(74) Representante: (incluirl dirección y teléfono)

Porzio, Ríos & Asociados

Marino Porzio y/o Hernán Ríos y/o Cristóbal Porzio y/o Rafael

Covarrubias, domiciliados en calle Santa Lucía No.330, Piso 7°,

SANTIAGO DE CHILE - (Fono 639 77 11 - Fax 632 67 32-

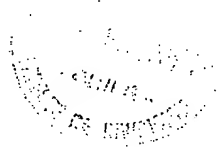
e-mail: porzio@porzio.cl - MAIL - P.O.Box 10.294)

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

Sistema de muerte celular en plantas.

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Se provee un medio por el cual las plantas contengan en su genoma un gen quimérico que, cuando se expresa, produce una proteína que tiene un efecto citotóxico. La citotoxicidad se logra por medio de una proteína o una parte de la misma que tiene la capacidad de bloquear la síntesis de proteínas celular, tal como una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma. El gen quimérico puede comprender un promotor ligado operativamente a una secuencia que codifica una proteína capaz de bloquear la síntesis de proteínas celular de modo que el promotor es inducible en y/o adyacente a un sitio blanco.



MEMORIA DESCRIPTIVA

SISTEMA DE MUERTE CELULAR EN PLANTAS

La presente invención se relaciona con un sistema de muerte celular en plantas y, en particular, con plantas transgénicas que contienen en su genoma un gen quimérico que al expresarse produce una proteína citotóxica.

Uno de los medios disponibles para los criadores de plantas que procuran obtener cultivares nuevos es la producción de híbridos entre cultivares existentes que contengan las características deseables. En general, los híbridos son superiores en cuanto a diversas características con respecto a cualquiera de los progenitores, un fenómeno conocido como vigor híbrido. Dichos cruzamientos híbridos se suelen llevar a cabo mediante una polinización cruzada manual, un procedimiento tedioso y que requiere mucho tiempo.

Durante la producción de dichos cruzamientos híbridos resulta vital prevenir la autopolinización. Para lograrlo, se puede emascular el progenitor femenino manualmente, por ejemplo en la producción de maíz híbrido por separación de las espiguillas. Sin embargo, una emasculación a gran escala de especies con flores hermafroditas no es factible desde un punto de vista económico. Las líneas progenitoras femeninas (con esterilidad masculina) también se pueden generar con esterilidad masculina genética, una característica conocida en muchas plantas, siendo habitualmente una característica recesiva y monogénica. El problema con este enfoque es que es difícil obtener líneas puras de progenitores con esterilidad masculina para cada cruzamiento. El sistema de uso más amplio en la producción de esterilidad masculina para la obtención de híbridos es la esterilidad masculina citoplasmática ^{CMS} (CMS). En este caso, hay factores citoplasmáticos que son

emc

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
11 DE ABRIL DE 2000
C.M.S.

responsables del aborto del polen. En aquellos cultivos donde se ha identificado una cms en el germoplasma, ha sido de uso extensivo, por ejemplo en maíz, girasol. Existen, no obstante, algunas desventajas con este sistema: el citoplasma con esterilidad masculina puede estar asociado con otras características no deseadas, por ejemplo el citoplasma T en maíz y la susceptibilidad a *Helminthosporium maydis*; su aplicación requiere de líneas isogénicas conservadoras con fertilidad masculina con el fin de propagar al progenitor masculino; y está limitado a especies en las cuales se pueda disponer de una fuente citoplasmática de esterilidad.

Otra ventaja de un sistema de esterilidad masculina sería la producción de plantas libres de polen. Esto sería deseable en numerosas variedades de flores ornamentales y también tendría aplicación en la contención de rasgos genéticos por estar impedido el entrecruzamiento.

Otra propiedad deseable de un sistema de esterilidad es que las plantas con esterilidad femenina se podrían producir de manera tal que el desarrollo de los frutos tuviera lugar en ausencia del conjunto de semillas. Las variedades de frutos sin semillas serían ventajosas para el procesamiento, por ejemplo, de tomates y también sería conveniente para el consumidor, por ejemplo en el caso del melón. Las variedades sin semillas existen actualmente y hay programas de cría bien establecidos, pero el desarrollo de frutos sin semillas ha sido limitado por la disponibilidad del germoplasma apropiado en muchas especies.

En los casos donde no se dispone de una fuente genética de esterilidad o no es factible por otros motivos, un enfoque consistente de una modificación genética proveería esterilidad al proporcionar un sistema de muerte celular por

el cual se produzca necrosis en células específicas de los tejidos reproductores.

En la publicación WO 89/10396 se describe un sistema de muerte celular en plantas por el cual se introduce un gen quimérico en una planta, donde dicho gen quimérico comprende un promotor específico de anteras unido a una proteína o polipéptido RNasa que, cuando se expresa, provoca la interrupción del metabolismo celular. Por consiguiente, la expresión del gen quimérico da como resultado la necrosis de las células de la antera y por lo tanto en esterilidad masculina en las plantas.

El sistema de muerte celular de la invención podría ser de utilidad para proveer esterilidad femenina en plantas, por el cual el sitio blanco puede ser el óvulo de la planta.

En las publicaciones WO 93/18170 y WO 92/04453 se describen sistemas de muerte celular en plantas que son específicos para controlar una infección por nematodos. En las publicaciones WO 93/18170 y WO 92/04453, se introduce un gen que comprende una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica un producto capaz de interrumpir un ataque por nematodos en especies de plantas huésped. El gen comprende además una región promotora, donde dicha región promotora controla la expresión de la secuencia de codificación, de manera tal que dicha expresión tiene lugar cuando se produce un ataque por nematodos y se localiza sustancialmente dentro o adyacente a los sitios de alimentación de los nematodos. Con el fin de interrumpir el ataque por nematodos, el producto puede ser nocivo para las células vegetales que se diferencian en células de los sitios de alimentación de los nematodos, o adyacentes de los mismos, o

directamente nocivo para los nematodos.

Los nematodos parásitos de plantas de importancia económica incluyen los nematodos quísticos de papa (*Globodera rostochiensis* y *G. pallida*), nematodos quísticos de soja (*Heterodera glycines*), nematodo quístico de remolacha (*Heterodera schachtii*) y nematodo quístico de cereales (*Heterodera avenae*) y nematodos de nudos de la raíz, tal como *Meloidogyne* spp. Dichos nematodos parásitos de plantas son patógenos importantes de muchos cultivos en todo el mundo, por ejemplo de verduras, leguminosas, tomate, sandía, uvas, maní, tabaco y algodón.

El control químico, las prácticas culturales y el uso de variedades vegetales resistentes constituyen los enfoques principales disponibles actualmente para controlar los nematodos y a menudo se utilizan de manera integrada contra los nematodos parásitos de plantas. Persiste la necesidad de mejorar el control de nematodos porque los enfoques actuales ofrecen una protección inadecuada de los cultivos. Los nematocidas son cuestionables desde un punto de vista ambiental y a menudo no son eficaces. El control cultural implica pérdidas ocultas para los cultivadores de diversas maneras. El amplio rango de huéspedes de los nematodos de nudos de la raíz limita la disponibilidad de cultivos que no son huéspedes que sean económicamente rentables. A menudo no se dispone de cultivares resistentes efectivos y aquellos que pueden ser usados por el cultivador a veces son desplazados por cultivares susceptibles con densidades bajas de nematodos. Además, es posible que se pierda la resistencia en las temperaturas altas de las tierras en los ambientes tropicales y subtropicales.

Se pueden concebir otras aplicaciones de los sistemas de muerte celular

en plantas. Por ejemplo el sitio blanco puede ser una parte específica de la flor, con lo cual se puede alterar la morfología de la flor. Como alternativa, el sitio blanco puede ser las raíces laterales, espinas o pelos urticantes. La abscisión de las hojas o los frutos se puede lograr si el blanco es la zona de abscisión de las hojas o los frutos. Se puede facilitar la liberación de las semillas de las plantas, si se usa el fúnculo como blanco. Al utilizar otros órganos como blanco, tal como tricomas, donde dichos tricomas son típicamente glandulares, se puede disminuir o impedir la producción de sustancias químicas por estos órganos. Otra aplicación puede ser la abscisión inducible de raíces, hojas, flores o frutos al final de la estación de crecimiento.

Las proteínas desactivadoras de ribosomas (RIP) constituyen un grupo de proteínas tóxicas para plantas que desactivan catalíticamente a los ribosomas eucariontes (Stirpe y Barbieri 1986). Las RIP funcionan como *N*-glucosidasas eliminando una adenina específica en un bucle conservado del ARNr grande y de esa manera impide la unión del Factor de Elongación 2, bloqueando así la síntesis de proteínas en la célula.

Se han descrito tres formas de RIP. Las RIP de tipo 1, tal como la proteína antiviral de hierba carmín y el inhibidor de la traducción de cebada están compuestas cada una por una sola cadena de polipéptidos, cada una con un valor M_r aproximado de 30.000. Las RIP de tipo 2, tal como la ricina, abrina y modeccina, comprenden cada una dos cadenas de polipéptidos. El polipéptido con actividad RIP (cadena A) está ligado mediante un enlace disulfuro a una lectina de unión a galactosa (cadena B; Stirpe *et al* 1978). El valor M_r de cada RIP de tipo 2 es de aproximadamente 60.000.

La RIP de maíz, que se encuentra en el endosperma de maíz (*Zea*

mays) es una RIP de tipo 3. Esta RIP se sintetiza como una sola cadena de polipéptidos que posteriormente sufre clivaje proteolítico liberando dos dominios peptídicos activos. La RIP de maíz comprende dos dominios, el dominio α y el dominio β , estando separados dichos dominios en la forma inactiva de RIP-maíz (es decir, pro-RIP de maíz) por un espaciador peptídico central y flanqueados por péptidos N y C terminales. El dominio α está ubicado hacia el extremo N terminal de la pro-RIP; el dominio β está ubicado hacia el extremo C terminal. Durante la germinación de las semillas, la pro-RIP de maíz es activada por el clivaje proteolítico de los péptidos N y C terminales junto con el espaciador peptídico central de manera tal que los dos dominios forman la RIP de maíz madura (activa) (Patente de EE.UU. N°: 5.248.606). El clivaje es llevado a cabo por proteasas endógenas.

La presente invención provee un método para producir una planta transgénica que contiene en su genoma un gen quimérico, donde ^{la} expresión de dicho gen causa citotoxicidad en la planta, donde la planta es transformada con un gen quimérico que comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma.

Tal como se utiliza en este documento, el término "parte" significa una parte de un gen que codifica una RIP de maíz, siendo dicha parte activa en la inhibición de la síntesis de proteínas.

La presente invención provee además una planta transgénica transformada con un gen quimérico que comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a

una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma.

La presente invención provee además una célula vegetal recombinante transformada con un gen quimérico que comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma.

La presente invención también provee un ADN aislado de un gen quimérico que comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma.

La presente invención provee además un vehículo de expresión biológicamente funcional que contiene un gen quimérico que comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma.

La secuencia de codificación de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz descrita en esta invención puede comprender la secuencia pro-RIP completa descrita previamente que comprende el péptido N-terminal, el dominio α , el péptido espaciador central, el dominio β y el péptido C-terminal.

Como alternativa, la secuencia de codificación de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz puede comprender una RIP recombinante "madura", descrita aquí como "RIP-P", que comprende el dominio α y el

SECRET

dominio β dispuestos de forma contigua, es decir se eliminaron las extensiones N y C terminales y el péptido espaciador central. La presente invención demuestra que la provisión de una molécula RIP funcionalmente activa no depende de ninguna restricción de conformación debida a la molécula pro-RIP intacta o a la reacción de clivaje. La actividad funcional en los sistemas de traducción libres de células de las moléculas RIP recombinantes que no contienen el espaciador central y los péptidos terminales se describió en las Patentes de EE.UU. N°: 5248606 y 5646026.

La secuencia de codificación de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz comprende preferentemente una RIP recombinante que solamente contenga el dominio α o una RIP recombinante que solamente contenga el dominio β , donde cada uno de los dominios α o β conforman una parte de la proteína activadora de ribosomas de maíz que adquirió funcionalidad. El dominio α de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz es el dominio ubicado hacia el extremo N terminal de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz, en tanto el dominio β de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz es el dominio ubicado hacia el extremo C terminal de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz. Si se incluyen ácidos nucleicos adicionales en el dominio α o β , entonces la parte activa aún será solamente los dominios α o β .

Sin tener en cuenta una teoría particular, se cree que el dominio α comprende las regiones de reconocimiento y unión a ribosomas, mientras que se cree que el dominio β comprende el sitio catalítico necesario para la eliminación de purinas/clivaje del ribosoma. Antes de la presente invención se consideraba que el dominio β era esencial para proveer una proteína

desactivadora de ribosomas de maíz activa. Por consiguiente, fue inesperado encontrar que la inclusión del dominio α sola (es decir, sin el dominio β) se podía usar para interrumpir la función del ribosoma vegetal y dar como resultado la necrosis de las células vegetales.

La secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación pro-RIP es la que se muestra en la SEQ ID N°: 1 o una secuencia de codificación que sea homóloga de la misma; la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación RIP-P es la que se muestra en la SEQ ID N°: 2 o una secuencia de codificación que sea homóloga de la misma; la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación del dominio α es la que se muestra en la SEQ ID N°: 3 o una secuencia de codificación que sea homóloga de la misma; la secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación del dominio β es la que se muestra en la SEQ ID N°: 4 o una secuencia de codificación que sea homóloga de la misma.

Según la homología requerida de las secuencias de nucleótidos, se pueden usar diferentes condiciones de severidad en el procedimiento de hibridación utilizado para la búsqueda de secuencias similares. A modo de ejemplo y no como una limitación, los procedimientos de hibridación que emplean condiciones de gran severidad son como sigue: hibridación con ADN unido a filtros en NaHPO_4 0,5 M, dodecilsulfato de sodio 7% (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C y lavado en SSC 0,1x /SDS 0,1% a 68 °C (Ausubel F.M. et al, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, en la pág. 2.10.3). Otras condiciones de gran severidad que se pueden usar son bien conocidos en el arte. Los procedimientos de hibridación que emplean condiciones de

severidad moderada que se pueden usar son como sigue: hibridación con ADN unido a filtros en NaHPO_4 0,5 M, dodecilsulfato de sodio 7% (SDS), EDTA 1 mM a 65 °C y lavado en SSC 0,2x/SDS 0,1% a 42 °C (Ausubel *et al*, 1989, *supra*). Otras condiciones de severidad moderada que se pueden usar son bien conocidos en el arte. Se pueden emplear otras soluciones, tal como Citrato Salino Estándar (SSC) o (Fosfato de Sodio Salino EDTA) (SSPE) en los procedimientos de hibridación.

Las secuencias homólogas adecuadas son secuencias que son por lo menos un 70%, preferentemente un 80% y con mayor preferencia un 90% o 95% homólogos con cada secuencia enumerada en este documento, donde dichas secuencias homólogas retienen la actividad enzimática requerida.

Las secuencias adecuadas también pueden ser variantes de las mismas. El término variante con relación a la presente invención puede ser cualquier sustitución, variación, modificación reemplazo o supresión o adición de uno o varios ácidos nucleicos/aminoácidos de o a la secuencia, siempre que la secuencia resultante exprese o exhiba la actividad enzimática requerida. Un derivado o una mutación también pueden ser adecuados en la invención. Un derivado tiene algunas modificaciones, habitualmente químicas, en comparación con el polipéptido natural expresado por el ácido nucleico.

Convenientemente, el gen quimérico comprende además una secuencia terminadora, no traducida 3'. La secuencia terminadora se puede obtener de genes vegetales, bacterianos o virales. Los ejemplos de secuencias terminadoras adecuadas son: la secuencia terminadora de *rbcS* E9 de arveja, la secuencia terminadora *nos* derivada del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* y la secuencia terminadora 35S del virus en

10/10/89
10/10/89
10/10/89

La presente invención también provee un sistema de dos componentes para lograr muerte celular. Dichos sistemas de dos componentes se describen en las Solicitudes de Patente Internacional WO 98/32325 y WO 93/18170 según cuales se emplan dos o varios transgenes de manera tal que los efectos combinados de los productos de su expresión conducen a una muerte celular. Los componentes individuales son inactivos o inocuos por separado, pero exhiben un efecto citotóxico cuando están juntos. Cada transgen es dirigido por un promotor separado, siendo los promotores seleccionados de manera tal que sus perfiles de expresión se superponen en el sitio blanco deseado de muerte celular, pero no en otros tejidos. La presente invención describe un sistema de dos componentes que comprenden por separado el dominio α y el dominio β de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz, cada uno como una construcción transgénica separada dirigida por un promotor separado. Los ejemplos de promotores adecuados se describen más adelante y otros serán reconocidos por los especialistas en el arte. Dicho sistema de dos componentes se puede producir por el cruzamiento de dos

plantas, cada una de las cuales contiene un componente, por el apilamiento de transgenes mediante una transformación secuencial o simultánea con dos construcciones transgénicas o mediante transformación con una construcción que contiene ambos componentes en un solo casete. Los dos dominios pueden provenir de diferentes proteínas desactivadoras de ribosomas de maíz.

Preferentemente, el promotor es inducido específicamente o casi específicamente en y/o adyacente al sitio blanco. Si el promotor es inducido en un lugar distinto del sitio blanco y/o de las células adyacentes al sitio blanco, el promotor se expresa preferente y predominantemente en el sitio blanco y/o adyacente al mismo.

De acuerdo con una primera realización de la presente invención, el sitio blanco puede ser un sitio de alimentación de nematodos. Cuando se da el caso que el sitio blanco es un sitio de alimentación de nematodos, el promotor seleccionado puede ser inducido en y/o adyacente al sitio de alimentación de nematodos. Dicho promotor es inducido preferentemente con la infección por los nematodos de la planta. Un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor KNT1. El aislamiento del promotor KNT1 se describe en la Patente NZ N° 260511 y el método se describe más adelante. Otros promotores adecuados incluyen el promotor TobRB7 y los promotores Lemmi. El aislamiento del promotor TobRB7 se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO 94/17194 y el aislamiento de los promotores Lemmi se describe en la Solicitud de Patente Internacional, N° Publicación WO 92/21757.

El sitio de alimentación de nematodos puede comprender, por ejemplo, células vegetales en el sitio de infección local que luego se volverán a diferenciar para formar un sincicio (en el caso de los nematodos quísticos) o

células gigantes y/o las células hipertróficas secundarias (en el caso de los nematodos de nudos de la raíz) y/o una o varias entre las células sinciciales, células gigantes y las células hipertróficas secundarias.

Al buscar el sitio de alimentación de nematodos como blanco se puede obtener una planta resistente a nematodos. El término "planta resistente a nematodos" significa una planta que después de una infección por nematodos parásitos de plantas tiene la capacidad de prevenir, demorar o de otra forma afectar adversamente el crecimiento y desarrollo de los nematodos que atacan la planta, con lo cual se previene la acumulación de densidades económicamente significativas de los nematodos parásitos de plantas durante un período de crecimiento de un cultivo particular. Es decir, los nematodos pueden morir o se puede demorar el ciclo de vida de los nematodos, dando como resultado una demora en el tiempo necesario para alcanzar la madurez y por ende de producir huevos, o los nematodos hembra maduros pueden ser de menor tamaño y por consiguiente presentar una menor capacidad para poner huevos, dado que la deposición de huevos a menudo comienza después que los nematodos hembra hayan alcanzado un tamaño mínimo crítico.

La presente invención se puede aplicar, pero sin limitaciones al uso con las siguientes especies de nematodos: *Globodera* spp., *Heterodera* spp. y *Meloidogyne* spp.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, en lugar de resistencia a nematodos, el método está dirigido a lograr esterilidad masculina en plantas. Por ejemplo, el sitio blanco puede ser uno o varios entre el polen, las anteras o el tapete de la planta. Cuando el sitio blanco es el tapete, por ejemplo, el promotor seleccionado será inducido en y/o adyacente

al tapete. Un ejemplo de un promotor de tapete adecuado es el promotor TA29 de tabaco descrito en Mariani et al (1990). Los promotores específicos de anteras se describen en Twell et al (1991).

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, el método está dirigido a lograr esterilidad femenina en plantas. Por ejemplo, el sitio blanco puede ser el óvulo de la planta. Es decir, el promotor seleccionado será inducido en y/o adyacente al óvulo. Un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor AGL15 descrito en Perry et al, 1996.

De acuerdo con una cuarta realización de la presente invención, se manipula la morfología de la flor de una planta. Por ejemplo, el sitio blanco puede ser una parte específica de la flor, siendo la meta que cuando estas partes específicas de la flor no se desarrollan, entonces cambia la morfología de la flor. En este caso, el promotor seleccionado será inducido en y/o adyacente al sépalo, carpelo, pétalo y/o estambre. Los ejemplos de promotores adecuados se pueden obtener de los genes *agamous*, *apetala3*, *globosa*, *pistillata* y *deficiens* (Sieburth y Meyerowitz, 1997; Samach et al, 1997, y las referencias citadas en la misma).

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, el método se utiliza para promover o asistir en la abscisión de las hojas y/o los frutos de una planta. Por ejemplo, el sitio puede ser la zona de abscisión de la hoja y/o del fruto. Por consiguiente, el promotor seleccionado será inducido en y/o adyacente a dicha zona de abscisión.

Un sexto aspecto de la presente invención es el uso de tricomas como blanco, tratándose típicamente de tricomas glandulares. El promotor seleccionado es inducido en y/o adyacente a los tricomas. Al causar necrosis

en los tricomas de la planta, se puede impedir o detener la producción de sustancias químicas en los tricomas. Un séptimo aspecto de la presente invención es el uso de raíces laterales, espinas o pelos urticantes como blanco.

De acuerdo con un octavo aspecto de la presente invención, el método está dirigido al control de infecciones por virus. Durante una infección por virus hay una cantidad de genes que son inducidos específicamente, o casi específicamente, dentro de las células infectadas realmente por el virus. El promotor seleccionado será inducido en y/o adyacente a las células infectadas por el virus.

De acuerdo con un noveno aspecto de la presente invención, el método está dirigido a facilitar la liberación de semillas de las plantas, utilizando las semillas como blanco. Durante el desarrollo de las semillas hay una cantidad de genes que son inducidos específicamente, o casi específicamente, dentro de ciertas células/partes de las semillas.

De acuerdo con un décimo aspecto de la presente invención, se selecciona un promotor que sea inducible externamente y que es inducido, por ejemplo, en las raíces de la planta. Dicho promotor se podría usar para lograr la abscisión de la raíz al final de la estación de crecimiento. Los promotores comparables inducidos, por ejemplo, en los peciolo, pedicelos o pedúnculos de las hojas, se podrían usar para lograr la abscisión de hojas, flores o frutos al finalizar la estación de crecimiento.

Las técnicas para transformar plantas son bien conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*. Típicamente, en la transformación mediada por *Agrobacterium* se transfiere un vector binario que lleva al ADN extraño de interés, es decir un gen quimérico.

desde una cepa apropiada de *Agrobacterium* hasta la planta blanco por medio del cocultivo de *Agrobacterium* con explantes de la planta blanco. A continuación se regenera el tejido vegetal transformado sobre un medio de selección, donde dicho medio de selección comprende un marcador seleccionable y hormonas de crecimiento vegetal.

Otros métodos de transformación adecuados incluyen, por ejemplo, la transferencia directa de genes hacia protoplastos usando técnicas con polietilenglicol o de electroporación, bombardeo de partículas, microinyección y el uso de fibras de carburo siliconadas.

Las especies vegetales adecuadas que se pueden transformar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitaciones, arroz, trigo, maíz, canola, papa, tabaco, caña de azúcar, soja, tomate, maní, algodón, uvas, sandía, papaya, verduras y leguminosas.

Con el fin de lograr una mayor comprensión de la invención y para su mejor realización, a continuación se hará referencia a modo de ejemplo a las siguientes figuras adjuntas, donde:

La Figura 1 muestra el efecto de la actividad de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz (RIP-P) sobre ribosomas de tabaco determinado por la síntesis de proteína GUS;

La Figura 2 muestra el efecto de la dosificación de diferentes cantidades de ADN de RIP-P de maíz (20 µg a 0,02 µg) sobre ribosomas de tabaco determinado por la síntesis de proteína GUS;

La Figura 3 muestra el efecto de las proteínas RIP-P de maíz sobre ribosomas de tabaco determinado por la síntesis de proteína GUS;

La Figura 4 muestra el efecto de los dominios α y β por separado y de

SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO MEXICANO
SECRETARÍA DE ECONOMÍA
ESTADO MEXICANO

los dominios α y β combinados sobre ribosomas de tabaco determinado por la síntesis de proteína GUS;

La Figura 5 muestra un esquema de las construcciones promotoras pDVM35S y pATC KNT1 y de las construcciones pATC KNT2/RIP α : KNT1/RIP β utilizadas en la transformación vegetal;

La Figura 6 muestra los tamaños de los nematodos adultos en líneas de maíz control y transgénicas RIP graficados como la frecuencia acumulada;

La Figura 7 muestra los tamaños de las hembras que ponen huevos en las mismas líneas de maíz control y transgénica RIP que en la Figura 6 graficados como la frecuencia acumulada;

La Figura 8 muestra una comparación de los tamaños de nematodos de nódulos de la raíz adultos y ponedoras de huevos en líneas control y transgénicas graficada como la frecuencia acumulada;

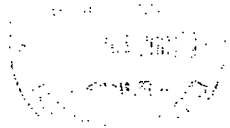
La Figura 9 muestra la cantidad de quistes y tres categorías de nematodos por cada línea transgénica. Las líneas A a G representan la progenie de transformantes RIP-P de maíz, las líneas I a Q representan la progenie de los transformantes con dos componentes RIP α /RIP β de maíz y las líneas P y H son controles no transformados;

La Figura 10 muestra el vector de transformación pATC en el cual se insertaron las construcciones RIP de la Figura 5 para la transformación de las plantas;

La Figura 11 muestra el vector de clonación pDE4, y

La Figura 12 es un diagrama esquemático de la producción de las variantes de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz por PCR.

EJEMPLOS



Clonación y secuenciación de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz

Se extrajo ADN genómico de plántulas de 14 días de la variedad Earli King de maíz.

Se diseñaron cebadores a partir de la secuencia de nucleótidos del ADN genómico RIP de maíz con el fin de generar variantes de las secuencias RIP, por eliminación de las regiones N y C terminales y el espaciador central. También se diseñaron cebadores para eliminar el sitio de restricción *SacI* en la secuencia RIP y facilitar de esa manera la clonación (Figura 12). Las secuencias RIP fueron amplificadas con la *Pfu* polimerasa.

La secuencia Pro RIP (SEQ ID N°: 1) se obtuvo por PCR a partir del ADN genómico de la siguiente manera:

Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR usando los cebadores PRORIPBF (SEQ ID N°: 5) más RIPSDF (SEQ ID N°: 14) y RIPSDF (SEQ ID N°: 13) más PRORIPSR (SEQ ID N°: 6), respectivamente. Los productos de la PCR se purificaron sobre gel y se combinaron. La extensión por superposición seguida de amplificación por PCR usando los cebadores PRORIPBF (SEQ ID N°: 5) y PRORIPSR (SEQ ID N°: 6) permitió obtener la secuencia ProRIP de longitud completa.

La PCR de ProRIP con los cebadores RIP1BF (SEQ ID N°: 7) y RIP2SR (SEQ ID N°: 8) permitió obtener un producto de PCR de aproximadamente 800 bp, correspondiente a los dominios RIP α , espaciador central y RIP β . Este producto ("RIP-CD") se digirió con las endonucleasas de restricción *XbaI* y *Sall*, se purificaron sobre gel, se ligaron en el vector pBluescript, se transformaron

en células XL1-Blue de *E. coli* y se secuenciaron. La secuencia era idéntica a la de la región equivalente del ADN RIP de maíz.

La región espaciadora central se eliminó de la siguiente manera: Se amplificó el ADN RIP-CD en dos reacciones de PCR usando los cebadores RIP1BF (SEQ ID N°: 7) más RIPCDR (SEQ ID N°: 12) y RIPCDF (SEQ ID N°: 11) más RIP2SR (SEQ ID N°: 8). Los productos de la PCR se purificaron sobre gel y se combinaron. La extensión por superposición seguido de PCR con los cebadores RIP1BF (SEQ ID N°: 7) y RIP2SR (SEQ ID N°: 8) permitió obtener RIP totalmente procesado (RIP-P). La RIP-P se digirió con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Sa*II, se purificaron sobre gel, se ligaron en el vector pBluescript, se transformaron en células XL1-Blue de *E. coli* y se secuenciaron. La secuencia RIP-P se muestra en este documento en la SEQ ID N°: 2).

Se llevaron a cabo reacciones PCR adicionales con RIP-CD usando cualquiera de los cebadores RIP1BF (SEQ ID N°: 7) más RIP1SR (SEQ ID N°: 9) o los cebadores RIP2BF (SEQ ID N°: 10) más RIP2SR (SEQ ID N°: 8), para amplificar los dominios RIP α o RIP β , respectivamente. Los dominios RIP α o RIP β fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *Xba*I y *Sa*II, purificados sobre gel, ligados en el vector pBluescript, transformados en células XL1-Blue de *E. coli* y secuenciados. Las secuencias de RIP α y RIP β se muestran en la SEQ ID N°: 3 y SEQ ID N°: 4, respectivamente.

2. Producción de construcciones que comprenden la proteína desactivadora de ribosomas de maíz para su evaluación en ensayos transientes con protoplastos

Se produjeron construcciones que contenían el promotor constitutivo 35S del virus en mosaico de la coliflor ligado a una secuencia de codificación

derivada de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz y una secuencia terminadora nos en un vector derivado de pDE4 (Denecke *et al*, 1990) (véase la Figura 11) adecuado para su uso en un sistema de expresión ^{transiente} en protoplastos ~~transiente~~. Se elaboraron las siguientes construcciones y los esquemas de las mismas se muestran en la Figura 5:

1. pDE4 35S/ Pro RIP
3. pDE4 35S/RIP P ("madura" RIP)
4. pDE4 35S/RIP α
5. pDE4 35S/RIP β

Ensayo transiente de construcciones RIP en protoplastos de tabaco

En este ensayo se detectó la desactivación de los ribosomas mediada por proteínas evaluando la síntesis de la proteína GUS. Los protoplastos se prepararon a partir de hojas de plantas de tabaco mantenidas *in vitro* y luego fueron sometidos a electroporación con las construcciones RIP. Se evaluó la eficacia de la traducción de proteínas de los ribosomas en los protoplastos de tabaco con un gen informante GUS en una construcción pDE4 bajo el control del promotor 35S CaMV. En la electroporación también se incluyó la construcción pDE4 GUS con cada construcción RIP. Con el fin de obtener los valores para los niveles óptimos de síntesis de proteína GUS en los protoplastos que competían con la segunda proteína, se usó un control GUS positivo, y los protoplastos de tabaco fueron transformados por electroporación con una construcción de la proteína chaperona BiP no tóxica, pDE800 (Leborgna-Castel *et al*, 1999) junto con la construcción GUS pDE4. Se usó también un control GUS negativo, por el cual los protoplastos de tabaco fueron transformados por electroporación con un vector pDE4 vacío junto con la

construcción de la proteína chaperona BIP no tóxica.

(i) RIP-P de maíz madura.

Las construcciones RIP-P de maíz fueron cotransformadas por electroporación con la construcción GUS en protoplastos de tabaco. El efecto de la actividad RIP de maíz sobre los ribosomas se evaluó midiendo los niveles de actividad GUS después de 24 horas de expresión (Figura 1). Se evaluó el efecto de dosificación de la construcción por electroporación de diferentes cantidades (0,02 µg a 20 µg) de la construcción RIP-P de maíz (Figura 2).

Los resultados demuestran que la proteína RIP-P madura de maíz desactiva los ribosomas de tabaco de manera eficaz. En consecuencia, solamente se observaron niveles basales de actividad GUS en comparación con el control GUS positivo.

La eficacia de la desactivación de los ribosomas dependía de la cantidad de ADN inicial incorporado por la electroporación en los protoplastos. Se observó que cantidades mayores de ADN RIP (20 µg) inducía rápidamente la desactivación de los ribosomas y solamente se detectaron niveles basales de actividad GUS. Por el contrario, cantidades menores de ADN inicial (0,02 µg) dieron como resultado una actividad GUS residual mucho mayor, posiblemente debido a una demora de RIP para alcanzar las concentraciones de proteína críticas y desactivar completamente a los ribosomas.

(ii) Actividad RIP de maíz en diferentes ribosomas de la célula:

Se llevó a cabo un experimento para evaluar si la proteína RIP-P de maíz para eliminar las purinas de los ribosomas tanto del retículo endoplasmático (ER) como de los del citosol. Como un ejemplo de una proteína sintetizada en el ER, la proteína α -amilasa posee una secuencia señal

N-terminal y la proteína es secretada a través del ER. Se cotransformó por electroporación una construcción de α -amilasa en protoplastos junto con la construcción RIP-P y también se usó una construcción GUS a efectos comparativos. Después de 24 horas de expresión, se efectuó un ensayo con amilasa (Figura 3).

Los resultados indicaron que no había una diferencia significativa entre el efecto de RIP-P sobre la α -amilasa y sobre las actividades GUS. La proteína RIP-P madura de maíz desactivó todos los ribosomas independientemente de su localización celular. Los resultados de estos ensayos con RIP-P de maíz indican que la enzima es muy efectiva para inducir una desactivación completa de los ribosomas y la subsiguiente atenuación o muerte celular.

(iii) Los dominios RIP de maíz separados

Las regiones de polipéptidos RIP α y RIP β de maíz también se expresaron individualmente o combinadas en protoplastos de tabaco (Figura 4).

Inesperadamente, la expresión de la proteínas RIP α sola dio como resultado una reducción significativa en la actividad GUS. Por el contrario, se encontró que la expresión de la proteína RIP β sola es inactiva. Sobre la base de las predicciones estructurales, la RIP α contiene las regiones del motivo de reconocimiento de ARN y del dominio de unión a ribosomas, pero no el sitio de residuo catalítico crítico. La proteína RIP α posiblemente impida la traducción de la proteína por unión a los ribosomas y de esa manera impide la traducción de la proteína. Esto implicaría que RIP α está adoptando una conformación de plegado correcto y que tiene la capacidad de efectuar un reconocimiento molecular específico. La proteína RIP β contiene el residuo del sitio activo que es necesario para eliminar las purinas de los ribosomas pero no cabe esperar

que tenga la capacidad de reconocer e interactuar con el ribosoma.

La expresión de ambas proteínas RIP α y RIP β de forma simultánea en protoplastos dio como resultado una reducción adicional de las actividades GUS en comparación con la proteína RIP α y RIP β por sí solas. Esto implica que los dos péptidos tienen la capacidad de interactuar y facilitar la eliminación de purinas de los ribosomas.

Aislamiento de un promotor que es inducido en y/o adyacente al sitio blanco

A continuación se describe un método para aislar un promotor, siendo dicho método a modo de ejemplo. El especialista en el arte conoce los métodos alternativos para aislar un promotor adecuado para su uso en la presente invención, algunos de los cuales fueron mencionados previamente como referencias.

El método para aislar el promotor KNT1 es como sigue:

Crecimiento e infección de plantas de tabaco

Se hicieron germinar semillas de tabaco C319 sobre abono Fisons F1 bajo las siguientes condiciones: intensidad lumínica de 4500 a 5000 lux; 16 hs día/8 hs noche; temperatura 20-25 °C. Después de aproximadamente 3 semanas, las plántulas se lavaron cuidadosamente con agua corriente para eliminar la tierra y fueron transferidas a bolsas (Northrup-King), a razón de 2 plantas por bolsa, y se cultivaron durante otra semana en un equipo Conviron a 25 °C con las condiciones de luz ya indicadas. Se levantaron las raíces en la bolsa y se les colocó un soporte de papel Whatman GF/A en las puntas. Se colocaron nematodos (*M. javanica*) de tres días de vida en las puntas de estas raíces en alícuotas de 10 μ l (50 nematodos) y luego se colocó un segundo

trozo de papel GF/A encima para encapsular por completo la punta de la raíz. Una vez transcurridas 24 horas después de la infección, se separó el papel GF/A con el fin de asegurar una infección sincrónica. Tres días después de la infección se recortaron los nudos de las raíces (dejando el tejido saludable y el tejido de las puntas de las raíces) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se cosecharon aproximadamente 0,5 –1,0 g. de tejido radicular infectado de 80 plantas inoculadas.

Coloración para visualizar los nematodos en las raíces infectadas

La calidad de la infección se estableció determinando la cantidad de nematodos infectantes por punta de raíz. Las raíces se cosecharon a partir del día 3 en las plantas infectadas y se sumergieron durante 90 segundos en lactofenol que contiene Cotton Blue 0,1% a 95 °C. Después de un lavado de 5 segundos en agua, las raíces se colocaron en lactofenol a temperatura ambiente (RT) durante 3-4 días para su aclaración. Los nematodos coloreados se visualizaron bajo microscopio óptico.

Aislamiento de ARN a partir de tejido radicular saludable e infectado

Se molió tejido radicular hasta obtener un polvo fino en mortero enfriado con nitrógeno líquido. Luego se transfirieron alícuotas de aproximadamente 100 mg a tubos para microcentrifuga también enfriadas y se agregaron 300 µl de buffer de extracción de fenol caliente (fenol 50%, buffer de extracción 50%: cloruro de litio 0,1 M, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 (RT), EDTA 10 mM, SDS 1%); se incubó todo a 80 °C durante 5 minutos. A continuación se agregó un volumen igual de cloroformo y el homogenato se centrifugó en microcentrifuga durante 15 minutos a 4 °C. Se extrajo la fase acuosa con 600 µl de fenol/cloroformo y se centrifugó en microcentrifuga como antes. Se volvió a separar la fase

acuosa y el ARN se precipitó con un volumen igual de cloruro de litio a 4 °C durante la noche. Se formó un pellet con el precipitado por centrifugación en microcentrífuga durante 15 minutos a RT y se lavó en etanol 70%. El pellet se liofilizó, se volvió a suspender en agua tratada con DEPC y se evaluó usando un espectrofotómetro. La calidad del ARN se evaluó por electroforesis sobre gel desnaturalizante. (Adaptado de Shirzadegan et al, 1991).

Clonación por substracción de ADNc específicos de la infección

Se aisló ARN poli(A)⁺ (ARNm) a partir de un total de 200 µg de muestras de ARN total de tejido de raíces C319 saludable e infectado usando perlas magnéticas oligo dT Dynabeads de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo *in situ* con la fracción de poli(A)⁺ unida a las perlas Dynabead del tejido saludable con el fin de proveer ADN conductor. La síntesis de la primera y segunda cadena se efectuó *in situ* con la fracción de poli(A)⁺ unida a las perlas Dynabead del tejido infectado con el fin de proveer ADN blanco. Todas las reacciones de ADNc se llevaron a cabo usando un juego de elementos de síntesis de ADNc de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Pharmacia). Tres oligonucleótidos, SUB21 (5' CTCTTGCTTGAATTCGGACTA 3') (SEQ ID N°: 15), SUB25 (5' TAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACA 3') (SEQ ID N°: 16) (secuencias de Duguid & Dinauer, 1990) y LDT15 (5' GACAGAAGCGGATCCd(T)₁₅ 3') (SEQ ID N°: 17) (O'Reilly, 1991) fueron sometidos a reacciones con quinasas usando la T4 polinucleótido quinasa de acuerdo con Maniatis et al (1982). Los nucleótidos SUB21 y SUB25 fueron alineados con el fin de formar un ligador que después se ligó al ADN blanco utilizando la T4 ADN ligasa de acuerdo con King & Blakesley (1986). A

continuación se lavaron exhaustivamente las perlas que llevaban el ADN blanco con TE y la segunda cadena de ADNc eluyó a 95 °C en SSC 5x.

El ARN unido al ADN conductor unido a las perlas Dynabead se separó por calor y el ADN blanco eluido se hibridizó con el ADN conductor a 55 °C en SSC 5x durante 5 horas. El ADN blanco que no se hibridizó se separó del ADN conductor unido a las perlas a temperatura ambiente (RT) según las instrucciones del proveedor, después de lo cual el ADN blanco hibridizante se separó de manera similar del ADN conductor unido a las perlas a 95 °C. El ADN blanco eluido a RT se reunió nuevamente con el ADN conductor y se repitió la hibridación. Este proceso se repitió hasta que la cantidad de blanco que se hibridizaba con el conductor ya no excedía la cantidad que no se hibridizaba. Las concentraciones de ADN se establecieron usando el juego DNA Dipstick (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Se usaron alícuotas de la fracción eluida con RT final en la amplificación por PCR (Eckert y Kunkel, 1990) con el fin de generar ADNc de cadena doble para la clonación en un vector plásmido. La amplificación del ADN blanco se logró usando los cebadores SUB21 (SEQ ID N°: 15) y LDT15 (SEQ ID N°: 17) bajo las condiciones descritas por Frohman et al, 1988. Los productos de la PCR se ligaron después en el vector pBluescript digerido con SmaI según la descripción de King y Blakesley (1986).

Búsqueda en la biblioteca de sustracción por análisis Northern inverso

Los recombinantes fueron identificados mediante PCR de colonias (Gussow y Clackson, 1989). Los insertos amplificados fueron sometidos a transferencia Southern por triplicado sobre membranas Pall Biodyne y según las instrucciones del proveedor. Tanto la prehibridación como la hibridación se

llevaron a cabo a 42 °C en SSPE 5x, BLOTTO 0,05%, formamida 50%. Las membranas se hibridaron por separado con sondas de ADNc (véase más adelante) de tejido saludable e infectado y con una sonda que comprendía el ADN blanco amplificado de la substracción final. Se seleccionaron los clones que solamente presentaban una señal de hibridación con la sonda de ADNc infectado o que solamente presentaban una señal de hibridación con la sonda substraída para su posterior análisis.

Generación de sondas de ADNc

Se trataron muestras de 10 µg de ARN total proveniente de tejido saludable e infectado con 2,5 unidades de Dnase1 a 37 °C durante 15 minutos. A continuación se desnaturalizó la Dnase1 a 95 °C durante 10 minutos antes de llevar a cabo la síntesis de ADNc usando el protocolo del proveedor (Pharmacia). El ARN se separó en presencia de hidróxido de sodio 0,4 M durante 10 minutos a RT y el ADNc se purificó a través de una columna Sephacryl 400HR. Se determinó el rendimiento y la concentración usando DNA Dipsicks (Invitrogen). El ADNc se marcó usando aproximadamente 35 ng/sonda con el protocolo de marcación de oligo estándar de Pharmacia.

Transferencia Northern

Con el fin de determinar el perfil de expresión de los clones seleccionados de las transferencias Northern inversas, se usaron como sondas en análisis Northern de ARN total o poli(A)⁺ de raíces, tallos, hojas y flores saludables e infectados. Los transferidos de ARN total comprendían 25 µg de ARN por línea, en tanto los transferidos de ARN poli(A)⁺ comprendían 0,5-1,0 µg de ARN por línea. El ARN fue sometido a electroforesis sobre geles de formaldehído y se transfirieron sobre membranas Pall Biodyne B como

describieron Fourny et al (1988). Las sondas se marcaron e hibridizaron como se describió previamente.

Transferencia Southern

Con el fin de determinar si los ADNc seleccionados eran de origen vegetal o de nematodo, se preparó ADN de tabaco C319 y de *M. javanica* como describieron Gawel y Jarret (1991). Los transferidos Southern preparados comprendían 10 µg de ADN digerido con EcoRI y HindIII por línea. Los transferidos se hibridizaron con sondas marcadas con oligos como se describió previamente.

Hibridaciones *in situ*

Con el fin de determinar la ubicación de la expresión de los ADNc de interés en el sitio de alimentación, se llevaron a cabo hibridaciones *in situ*. El tejido de las raíces infectadas y saludables se embebió en cera, se seccionó y se hibridizó con las sondas como describió Jackson (1991).

Aislamiento de los extremos 5' de los ARNm

Los extremos 5' de los ARN de interés se determinaron usando 5' RACE como describieron Frohman et al (1988).

Aislamiento de las regiones promotoras

Las regiones promotoras de los genes de interés se aislaron mediante PCR ligado a vectores. Se usaron 100 ng de muestras de ADN genómico C319 digerido con endonucleasas de restricción y el ADN se ligó durante 4 horas a RT (King y Blakesley, 1986) con 100 ng de muestra de pBluescript (digerido con una endonucleasa de restricción que producía extremos compatibles). Las enzimas que se usaron típicamente fueron *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *BglII*, *XhoI*, *Clal*, *Sall*, *KpnI*, *PstI* y *SstI*. A continuación se llevó a cabo la PCR con las

ligaciones usando un cebador vector tal como el cebador de secuenciación -40 y un cebador complementario del extremo 5' del ARNm. Los productos de la PCR se clonaron y secuenciaron. De ser necesario se repetía el proceso con un cebador nuevo complementario del extremo 5' del fragmento promotor con el fin de asegurar que se hubieran aislado las secuencias control de los promotores.

Se identificó un gen, KNT1, usando los procedimientos descritos y se aisló de las plantas de tabaco. Se aisló un fragmento promotor KNT1 de aproximadamente 0,8 Kbp de longitud del sitio de inicio de la transcripción y se insertó en el vector informante GUS, pBI101 (Jefferson et al, 1987). La construcción resultante, pBIN05101, se usó para transformar plantas de tabaco. Después de una infección con *M. javanica*, se observó una fuerte expresión GUS en el sitio de alimentación de los nematodos.

Se demostró que el gen KNT1 tenía homólogos en especies de plantas distintas de tabaco. Estas especies incluyen, pero sin limitaciones, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* y *Beta vulgaris*. El gen KNT1 también es inducido tanto por las especies de nematodos de nudos de la raíz como por especies de nematodos quísticos.

La construcción pBIN05101 se depositó en Advanced Technologies (Cambridge) Limited de 210 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WA, Inglaterra bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos de acuerdo con el Procedimiento para Patentes en National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB), 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia el 20 de marzo 1997, con el número de acceso NCIMB 40870. El vector contiene los

bordes derecho e izquierdo del ADN-T de la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*. Entre los bordes hay un sitio de clonación múltiple y un gen de resistencia a kanamicina bajo el control de un promotor vegetal (Nos). Fuera de los bordes, el vector contiene un gen de resistencia a kanamicina bacteriano. El inserto en el vector consiste en un promotor KNT1, la secuencia de codificación de la glucuronidasa, el terminador Nos.

Producción de construcciones para los estudios de transformación vegetal, donde las construcciones comprenden la proteína desactivadora de ribosomas de maíz y promotores que son inducidos en y/o adyacente al sitio de alimentación de nematodos

Se usaron construcciones que contenían el promotor KNT1 que responde a nematodos ligado a la secuencia de codificación de la proteína desactivadora de ribosomas de maíz y un terminador nos en un vector de transformación vegetal derivado de pATC (Figura 10) en los estudios de transformación. Estos fueron diseñados para estudiar la eficacia de las construcciones RIP para inducir muerte celular en los sitios de alimentación establecidos por los nematodos. Las construcciones se ensamblaron en el vector pDVM y luego se recortaron los casetes transgénicos con la endonucleasa de restricción *NotI* y se clonaron en el vector binario pATC. Las construcciones se introdujeron en LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación.

Las construcciones obtenidas fueron como sigue:

1. pATCKNT1/Pro RIP
2. pATCKNT1/RIP-P
3. pATCKNT1/RIP α

4. pATCKNT1/RIP β

Se preparó una construcción final que comprendía las regiones de codificación de RIP α y RIP β bajo dos promotores que responden a nematodos separados (Figura 5). El segundo promotor usado se denominó KNT2 (véase la SEQ ID N°: 18). Esta construcción se denominó: pATC KNT2/RIP α :KNT1/RIP β .

El promotor KNT1 se expresa en las células de los sitios de alimentación, en las puntas de las raíces y, en un grado mucho menor, en otros meristemas. El promotor KNT2 se expresa en el cuerpo radicular y en las células de los sitios de alimentación (pero no en las puntas de las raíces). Por lo tanto, hay una superposición en la expresión en las células del sitio de alimentación que causa una mayor citotoxicidad vegetal específica cuando los dominios α y β se expresan de forma conjunta.

Las construcciones adecuadas para su uso en cualquiera de las otras realizaciones de la invención se preparan de manera similar usando las mismas técnicas que se describieron previamente y seleccionando los promotores de direccionamiento apropiados.

Producción de plantas transgénicas que contienen las construcciones RIP de maíz bajo el control de promotores inducibles por nematodos.

Todas las construcciones anteriores (véase la Figura 5) se introdujeron en papa cv. Hermes y tabaco cv. K326, por medio de cocultivo de discos de hojas usando LBA4404 *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al, 1985).

Se generaron plantas transgénicas de papa y tabaco y se efectuaron pruebas de resistencia a nematodos en invernadero.

Pruebas de resistencia usando plantas de tabaco infectadas con

Meloidogyne javanica

Se plantaron plántulas de tabaco transgénicas y control con un diseño experimental ciego randomizado en abono fino para macetas en envases de polietileno reciclado [rootrainer] sin fertilizante y se entresacó aproximadamente la mitad de las hojas más grandes. Las plantas se cubrieron con un polietileno para mantener una humedad alta durante la adaptación. Se fueron recortando agujeros de forma gradual en el polietileno para disminuir la humedad antes de completar la adaptación. Una semana después de la adaptación, las plantas pequeñas se infectaron con 200 nematodos J2 eclosionados de *Meloidogyne javanica*. A continuación solamente se regaba con nutrientes líquidos una vez que el suelo se había secado tanto que las hojas habían comenzado a marchitarse. Los envases [rootrainer] se colocaron en bandejas sobre esteras calentadas para mantener la temperatura de la tierra entre 25-30 °C. Se entresacaron hojas una vez por semana con el fin de nivelar el crecimiento y prevenir que los puntos de crecimiento se cubrieran con hojas grandes debido a la densidad de la siembra.

Las plantas se cosecharon para su calificación aproximadamente 4 semanas después de la infección. Típicamente, se lavaron las raíces y luego se calificó el crecimiento radicular, el nivel de formación de quistes y el tamaño de los quistes.

Pruebas de resistencia usando plantas de papa infectadas con Globodera pallida patovar 2/3

Las pruebas de resistencia primaria de las plantas transgénicas se llevaron a cabo en ensayos ciegos randomizados con lotes de 20 a 25 líneas transgénicas con por lo menos diez replicaciones de 2 o varias líneas control.

Los envases o contenedores de polietileno [*roottrainer*] se llenaron con una mezcla de tierra negra y arena 50:50. Se humedecieron 12 litros de tierra negra y arena con 1250 ml de agua para obtener un contenido de agua del 40%. Se colocaron 3 quistes sobre las raíces de cada plántula, luego se insertaron en un orificio en el abono que después se acomodó cuidadosamente alrededor de las raíces. Se permitió que las plantas se adaptaran y después solamente se regaron una vez por semana con nutrientes líquidos o cuando la tierra se había desecado lo suficiente. Una vez que las plantas habían alcanzado aproximadamente 10 cm de altura, se entresacaron las puntas para nivelar el crecimiento.

Las plantas se cultivaron durante aproximadamente tres meses para permitir que los quistes maduren. A continuación, se dejó que las plantas se secaran durante otro mes. Se recuperaron los quistes de las plantas lavando vigorosamente la tierra y las raíces en una cubeta con 250 ml de agua. Se dejó que la tierra se asentara durante unos pocos minutos y luego se vertió el sobrenadante en un embudo de filtro grande con un disco de papel de filtro Whatman N° 1 de 32 cm de diámetro. El sobrenadante se dejó en reposo en el embudo durante un minuto y luego se tocó apenas el centro de la superficie de la solución con una gota de detergente Hederol para desplazar el material sobre el menisco superficial de la solución hacia el costado del filtro. Luego se rasgó la base del filtro para separar el resto de la solución. Se retiró el disco de filtro y se efectuó un recuento de la cantidad de quistes adheridos al mismo.

Se consideró que las plantas presentaban signos de resistencia se estaban infectados con menos quistes que las líneas control susceptibles.

Calificación de la infección de tabaco y papa con nematodos mediante coloración

Se utilizaron plantas de tabaco provenientes de cultivos tisulares o plántulas y se cultivaron como se describió previamente con la siguiente modificación. Las plantas fueron infectadas con 1000 nematodos J2 eclosionados *Meloidogyne javanica*. Las plantas de papa fueron infectadas con *Globodera pallida* como se describió previamente.

Un mes después de la infección, se tomaron estacas de las plantas. Se lavaron las raíces para quitar la tierra y se blanquearon durante 4 minutos en hipoclorito de sodio 1%. El blanqueador se eliminó enjuagando con agua y embebimiento posterior en un volumen grande de agua durante 15 minutos con agitación ocasional. Las raíces se colocaron después en 10 a 15 ml de una dilución 1:500 de una solución madre de fucsina ácida en ácido acético 5%. (La solución madre de la fucsina ácida se preparó de acuerdo con la descripción en 'Introduction to Plant Nematology' de V. H. Dropkin, ISBN 0-471-85268-6. Se disolvieron 0,35 g de fucsina ácida en 100 ml de ácido acético glacial y agua destilada 1:3). Las muestras en el colorante se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante 4 minutos y luego se transfirieron a 37 °C durante cuatro horas. Se decantó el colorante y las muestras se aclararon por adición de glicerol acidificado y se incubaron a 37 °C durante la noche.

Las raíces aclaradas con los nematodos coloreados se montaron en cajas de Petri (la muestra se colocó sobre el lado interno de la tapa de la caja de Petri y la base de la caja de Petri se usó para dispersar y comprimir la muestra a fin de visualizarla con mayor facilidad bajo el microscopio).

Las muestras se observaron con un aumento de 20 a 100 x y los

nematodos fueron clasificados de varias maneras. Los nematodos de los nudos de la raíz se dividieron en tres grupos: a) nematodos vermiformes, b) nematodos con forma de saco que no están produciendo huevos y c) nematodos con forma de saco productores de huevos. Se tomaron los diámetros de los nematodos que esencialmente tenían forma de saco usando un ocular con cuadrícula. Los nematodos quísticos también se dividieron en tres categorías: a) nematodos vermiformes; b) nematodos vermiformes gordos que no producen huevos; y c) nematodos globosos que producen huevos. Se tomaron los diámetros de los nematodos esencialmente globosos usando un ocular con cuadrícula.

Los efectos de resistencia se midieron en términos de cantidad absoluta de nematodos en los sistemas radiculares, en términos de la proporción de nematodos que alcanzaran la madurez y producción de huevos y en términos del tamaño de los nematodos.

Se identificó una cantidad de líneas resistentes de tabaco y papa que expresaban RIP de maíz como un componente efector individual así como un sistema de dos componentes.

Ensayo en maceta de líneas seleccionadas de papa RIP de maíz

Se replicaron tubérculos germinados de papas seleccionados de líneas cv Hermes y se usaron en una prueba estándar de resistencia a nematodos quísticos de papa con *G. pallida* raza 2/3 para la cual solamente se dispone de una resistencia parcial. Las papas comprendían cuatro líneas transformadas con la proteína RIP-P procesada de maíz y cuatro líneas transformadas con la construcción de dos componentes RIP α /RIP β . La prueba incluyó papas no transformadas de Hermes y Prairie como tubérculos madre (control) y material

que había pasado por el mismo procedimiento de cultivo tisular que las plantas transgénicas (ncc control). Además, la prueba incluyó las variedades control no transformadas Desiree y Maris Piper (ambas susceptibles a PCN) y Sante (resistencia parcial a PCN raza 2/3, la mejor línea disponible comercialmente).

En la Tabla 1 se ofrece un resumen de los resultados expresados como porcentaje de susceptibilidad de las líneas transgénicas con relación a controles no resistentes.

Tabla 1

Construcción	Cultivar	Línea	Porcentaje de susceptibilidad
RIP P	Hermes	1	143
RIP P	Hermes	10	72
RIP P	Hermes	13	45**
RIP P	Hermes	15	63
RIP α /RIP β	Hermes	9	44**
RIP α /RIP β	Hermes	11	65
RIP α /RIP β	Hermes	14	103
RIP α /RIP β	Hermes	15	88
Control NCC	Hermes		90
Control	Hermes		139
Control NCC	Prairie		115
Control	Prairie		93
Control	Desiree		94
Control	Maris Piper		62
Control	Sante		21

Se observó un alto grado de variación en los recuentos de quistes PCN tanto entre controles como entre replicaciones individuales, lo cual puede ser atribuido a factores ambientales. Sin embargo, una línea RIP procesada de maíz (RIP-P) y una línea RIP de dos componentes de maíz presentaron una reducción significativa en la susceptibilidad con relación a las líneas control. Estas líneas están marcadas con ** en la Tabla 1. En el sistema de dos componentes, resulta inesperado observar que algunas plantas permanecen viables, a pesar de la expresión de RIP α o β en los sitios no superpuestos.

Análisis de los nematodos en líneas transgénicas de tabaco que expresan RIP de maíz

Se infectó la progenie de líneas transgénicas de tabaco transformadas con la proteína RIP-P procesada de maíz o la construcción de dos componentes RIP de maíz con nematodos de nódulos de la raíz. Un mes después de la infección, las raíces de las plantas infectadas fueron tratadas con fucsina ácida para colorear los nematodos *in situ*. Se efectuó un recuento de quistes y nematodos coloreados y se dividieron en las siguientes cuatro categorías; quistes vacías, juveniles vermiformes, adultos esféricos, adultos que ponen huevos (Figura 9).

Si bien no se observaron diferencias significativas en la cantidad total de nematodos y quistes por línea entre las líneas transgénicas y los controles, hubo tres líneas transgénicas, D, G y K, que presentaron menos adultos que ponían huevos.

Con el fin de determinar si las líneas RIP de maíz reducen el crecimiento de los nematodos en las plantas, se midió el tamaño de los nematodos adultos como se describió anteriormente.

Los nematodos adultos que no ponían huevos eran significativamente más pequeños en las líneas D, G & K en comparación con los de las plantas control (Figura 6). Sin embargo, las diferencias en los tamaños de los nematodos que ponían huevos eran mucho menores (Figura 7), lo cual indicaba que la deposición de huevos solamente podía tener lugar cuando los nematodos habían alcanzado un tamaño mínimo (de 32 a 36 unidades de cuadrícula). La expresión de RIP parece disminuir el crecimiento del nematodo, dando como resultado una demora para alcanzar el tamaño necesario para poner huevos (Figura 8).

Por el contrario, aquellas líneas que no mostraban ninguna reducción en la cantidad de nematodos infectantes o en la cantidad de hembras que ponían huevos no presentaban tampoco la disminución en el tamaño de las hembras adultas que se observó con las líneas D, G & K.

Por ello es que estos resultados indican que las construcciones RIP de maíz y dos componentes RIP de maíz afectan el desarrollo de los nematodos de los nódulos de la raíz.

Referencias.

- Denecke J., Betterman J. y Deblaere R. (1990) *The Plant Cell* 51-59
- Duguid J.R. y Dinauer M.C. (1990) *Nucleic Acids Research* 18(9) 2889-2792
- Eckert K.A. y Kunkel T.A. (1990) *Nucleic Acids Research* 18(13) 3737-3744
- Fourney R.M., Miyakoshi J., Day III R.S. y Paterson M.C. (1988) *Focus* 10(1) 5-7

- Frohman M.A., Dush M.K. y Martin G.R. (1988) *Proceedings of the Natl. Acad. Sci. USA.* **85** 8998-9002
- Gawel N.J. y Jarret R.L. (1991) *Plant Molec. Biol. Reporter.* **9**(3) 262-266
- Gussow D. y Clackson T. (1989) *Nucleic Acids Research* **17** 4000-4008
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eicholtz D., Rogers S.G. y Fraey R.T. (1985) *Science* **227** 1229-1231
- Jackson D. (1991) *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach.* IRL Press, Oxford.
- King P.V. y Blakesley R.W. (1986) *Focus* **8**(1) 1-3
- Leborgna-Castel N., Jelitto-Van Droven E.P.W.M., Crofts A.J. y Denecke J. (1999) *The Plant Cell* **11** 459-469
- Maniatis T., Fritsch E.F. y Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Mariana et al (1990) *Nature* **347** 737-741
- O'Reilly D., Thomas C.J.R. y Coutts R.H.A. (1991) *J. Gen. Virology* **17** 1-7
- Perry S.E., Nichols K.W. y Fernandez D.E. (1996) *The Plant Cell* **8** 1977-1989
- Samach A., Kohlami S.E., Motte P., Datla R. y Haughn G.W. (1997) *The Plant Cell* **9** 559-570
- Shirzadegan M., Christie P. y Seemann J.R. (1991) *Nucleic Acids Research* **19** (21) 6055
- Sieburth L.E. y Meyerowitz E.M. (1997) *The Plant Cell* **9** 355-365
- Stirpe y Barbieri (1986) *FEBS Lett.* **195**, 1-8.

Stirpe *et al* (1978) FEBS Lett 85 65-67.

Twell *et al* (1991) Molec. Gen. Genet. 217 240-245

Advanced Technologies
(Cambridge) Ltd.,
210 Cambridge Science Park,
Cambridge
CB4 4WA

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL
RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE
DEPÓSITOS DE MICROORGANISMOS
DE ACUERDO CON EL
PROCEDIMIENTO PARA PATENTES

Formulario Internacional

Recibo para el caso de un depósito original
emitido de acuerdo con la norma 7.1 de la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL identificada al pie de
esta página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación otorgada por el DEPOSITANTE.	Número de acceso otorgado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL;
Agrobacterium tumefaciens C58 pSIN05101	NCIMB 40870
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DENOMINACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado previamente en (I) se adjunta con:	
<input type="checkbox"/>	una descripción científica
<input checked="" type="checkbox"/>	la denominación taxonómica propuesta
(Marcar con una X lo que corresponda)	
III. RECIBO Y ACEPTACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado previamente en (I), recibido por la misma el 20 de marzo, 1997 (fecha del depósito original)	
IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
El microorganismo identificado previamente en (I) fue recibido por esta Autoridad Depositaria Internacional el (fecha del depósito original) y se recibió una solicitud para convertir el depósito original en un depósito correspondiente al Tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión)	
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Domicilio: (Hay un sello con los siguientes datos: NCIMB Ltd. 23 St. Machor Drive Aberdeen – Escocia UK – AB1 1RY)	Firma(s) de la(s) persona(s) con poder para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de oficiales autorizados: Fecha: 31 de marzo, 1997 Hay una firma.
1 Cuando se aplica la norma 6.4(d), dicha fecha es la fecha de adquisición del Estado de la Autoridad Depositaria Internacional.	

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DE
DEPÓSITOS DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO CON EL PROCEDIMIENTO
PARA PATENTES

Advanced Technologies (Cambridge) Ltd.,
210 Cambridge Science Park,
Cambridge
CB4 4WA

FORMULARIO INTERNACIONAL

DECLARACIÓN DE VIABILIDAD emitida
de acuerdo con la Norma 10.2 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL identificada en la
siguiente página

NOMBRE Y DIRECCIÓN DE LA PARTE
PARA LA CUAL SE EMITE LA
DECLARACIÓN DE VIABILIDAD

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Nombre: IGUAL QUE ANTES		Número de acceso otorgado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: NCIMB 40870	
Dirección:		Fecha del depósito o de la transferencia: 20 de marzo, 1997	
III. DECLARACIÓN DE VIABILIDAD			
La viabilidad del microorganismo identificado previamente bajo II se evaluó el 26 de marzo, 1997. ² En dicha fecha, el microorganismo citado era			
<input checked="" type="checkbox"/> ³ viable <input type="checkbox"/> ³ no viable			
¹ Indique la fecha del depósito original o, cuando se ha efectuado un depósito nuevo o una transferencia, la fecha importante más reciente (fecha del depósito nuevo o de la transferencia)			
² En los casos a los que se hace referencia en la norma 10.2(a)(ii) y (iii), refiérase a la prueba de viabilidad más reciente.			
³ Marque con una cruz el cuadro que corresponda.			
IV. CONDICIONES BAJO LAS CUALES SE EFECTUÓ LA PRUEBA DE VIABILIDAD⁴			
V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL			
Nombre: Domicilio: (Hay un sello con los siguientes datos: NCIMB Ltd. 23 St. Machor Drive Aberdeen – Escocia UK – AB1 1RY)		Firma(s) de la(s) persona(s) con poder para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de oficiales autorizados: Fecha: 31 de marzo, 1997 Hay una firma.	
⁴ Complete la información solicitada y si los resultados de la prueba fueron negativos.			

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta transgénica que contiene en su genoma un gen quimérico cuya expresión causa citotoxicidad en la planta en el sitio blanco, CARACTERIZADO PORQUE dicha planta es transformada con un gen quimérico que comprende un promotor que es inducido en y/o adyacente al sitio blanco ligado operativamente a una secuencia de codificación que codifica una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o un parte de la misma.
2. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADO PORQUE la secuencia de codificación de dicha proteína desactivadora de ribosomas de maíz comprende una pro-proteína desactivadora de ribosomas constituida por el extremo N-terminal, un dominio α , un péptido espaciador central, un dominio β y el péptido C-terminal.
3. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADO PORQUE la secuencia de codificación de dicha proteína desactivadora de ribosomas de maíz comprende una RIP madura recombinante que contiene un dominio α y un dominio β dispuestos de forma contigua.
4. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADO PORQUE la secuencia de codificación de dicha proteína desactivadora de ribosomas de maíz comprende una RIP recombinante que solamente contiene como parte activa al dominio α de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz.
5. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1, CARACTERIZADO PORQUE la secuencia de codificación de dicha proteína desactivadora de ribosomas de maíz comprende una RIP recombinante que

solamente contiene como parte activa al dominio β de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz.

6. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de codificación comprende la secuencia codificadora que se muestra en la SEQ ID N°: 1 o una secuencia codificadora homóloga de la misma.
7. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 1 ó 3, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de codificación comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 2 o una secuencia codificadora homóloga de la misma.
8. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 4, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de codificación comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 3 o una secuencia codificadora homóloga de la misma.
9. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 5, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia de codificación comprende la secuencia que se muestra en la SEQ ID N°: 4 o una secuencia codificadora homóloga de la misma.
10. El método para producir una planta transgénica acorde con las cláusulas 6, 7, 8 ó 9, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia codificadora homóloga presenta por lo menos un 70% de ^{identidad} homología con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3; o SEQ ID N°: 4, respectivamente.
11. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 10, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia codificadora homóloga presenta por lo menos un 80% de ^{identidad} homología con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°:

- 2, SEQ ID N°: 3; o SEQ ID N°: 4, respectivamente.
12. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 10 u 11, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia codificadora homóloga presenta por lo menos un 85% de ^{identidad} homología con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3; o SEQ ID N°: 4, respectivamente.
13. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 10, 11 ó 12, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia codificadora homóloga presenta por lo menos un 90% de ^{identidad} homología con la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3; o SEQ ID N°: 4, respectivamente.
14. El método para producir una planta transgénica acorde con cualquiera de las cláusulas precedentes, CARACTERIZADO PORQUE dicho (gen) ^{quimérico} además comprende una secuencia terminadora no traducida 3'.
15. El método para producir una planta transgénica acorde con la cláusula 14, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia terminadora no traducida 3' proviene de genes vegetales, bacterianos o virales.
16. El método para producir una planta transgénica acorde con cualquiera de las cláusulas 14 ó 15, CARACTERIZADO PORQUE dicha secuencia terminadora no traducida 3' se selecciona del grupo formado por la secuencia terminadora *rbcS* E9 de arveja, la secuencia terminadora ^{ABE} ~~nos deriva~~ del gen de la nopalina sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens* y la secuencia terminadora 35S del virus en mosaico de la coliflor.
17. El método para producir una planta transgénica acorde con cualquiera de las cláusulas precedentes, CARACTERIZADO PORQUE dicho (gen) ^{quimérico} comprende una secuencia potenciadora de la transcripción/traducción y/o secuencias direccionadoras intracelulares e

intrones, y/o secuencias de nucleótidos funcionales para facilitar el proceso de transformación y la expresión estable de dicho gen quimérico, *snr1*

18. El método para producir una planta transgénica acorde con cualquiera de las cláusulas precedentes, CARACTERIZADO PORQUE dicho (gen) quimérico comprende un primer promotor ligado operativamente a un dominio α de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz y un segundo promotor ligado operativamente a un dominio β de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz.

19. El método acorde con la cláusula 18, CARACTERIZADO PORQUE dichos primer y segundo promotores se expresan en un sitio blanco superpuesto.

20. El método acorde con la cláusula 18 ó 19, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer promotor es el promotor KNT1 y el segundo promotor es el promotor KNT2 (SEQ ID N°: 18).

21. Una planta transformada con el gen quimérico acorde con el método de cualquiera de las cláusulas 1 a 20, CARACTERIZADA PORQUE dicho (gen) quimérico comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas o una parte de la misma.

22. Una célula vegetal transformada con el gen quimérico acorde con el método de cualquiera de las cláusulas 1 a 20, CARACTERIZADA PORQUE dicho gen quimérico comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una

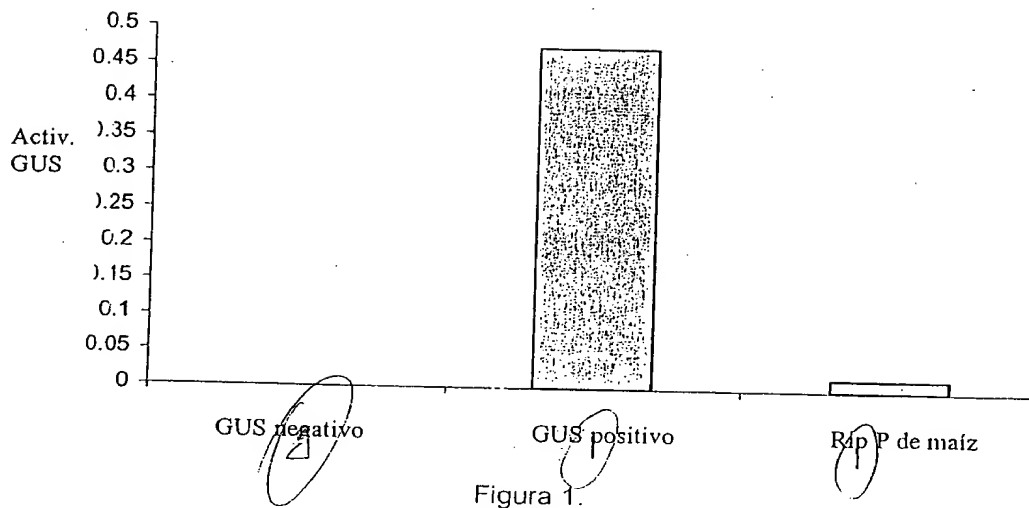
proteína desactivadora de ribosomas o una parte de la misma.

- 22 23. Un ADN aislado de un gen quimérico, CARACTERIZADO PORQUE comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas o una parte de la misma.
24. Un ADN aislado de un gen quimérico, CARACTERIZADO PORQUE comprende un primer promotor ligado operativamente a un primer dominio de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz y un segundo promotor ligado operativamente a un ^{dominio P}segundo dominio de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz.
25. El ADN aislado de un gen quimérico acorde con la cláusula 24, CARACTERIZADO PORQUE dichos primer y segundo promotores tienen un sitio (de expresión) superpuesto.
26. Un ^{vector}vehículo de expresión biológicamente funcional que contiene un gen quimérico, CARACTERIZADO PORQUE comprende un promotor, donde dicho promotor es inducido en y/o adyacente al sitio blanco, ligado operativamente a una secuencia de codificación, donde dicha secuencia de codificación codifica una proteína desactivadora de ribosomas o una parte de la misma.
- 26 27. El ^{vector}vehículo de expresión biológicamente funcional acorde con la cláusula 26, CARACTERIZADO PORQUE comprende un primer promotor ligado operativamente a un ^{dominio P}primer dominio de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz y un segundo promotor ligado operativamente a un ^{dominio P}segundo dominio de una proteína desactivadora de ribosomas de maíz.

SISTEMA DE MUERTE CELULAR EN PLANTAS

RESUMEN

Se provee un medio por el cual las plantas contengan en su genoma un gen quimérico que, cuando se expresa, produce una proteína que tiene un efecto citotóxico. La citotoxicidad se logra por medio de una proteína o una parte de la misma que tiene la capacidad de bloquear la síntesis de proteínas celular, tal como una proteína desactivadora de ribosomas de maíz o una parte de la misma. El gen quimérico puede comprender un promotor ligado operativamente a una secuencia que codifica una proteína capaz de bloquear la síntesis de proteínas celular de modo que el promotor es inducible en y/o adyacente a un sitio blanco.



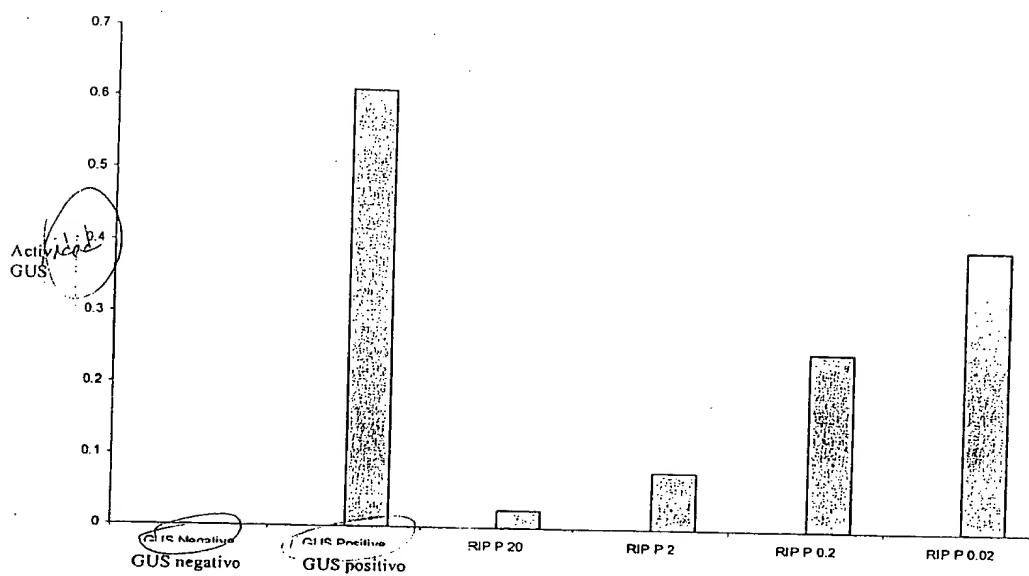


Figura 2.

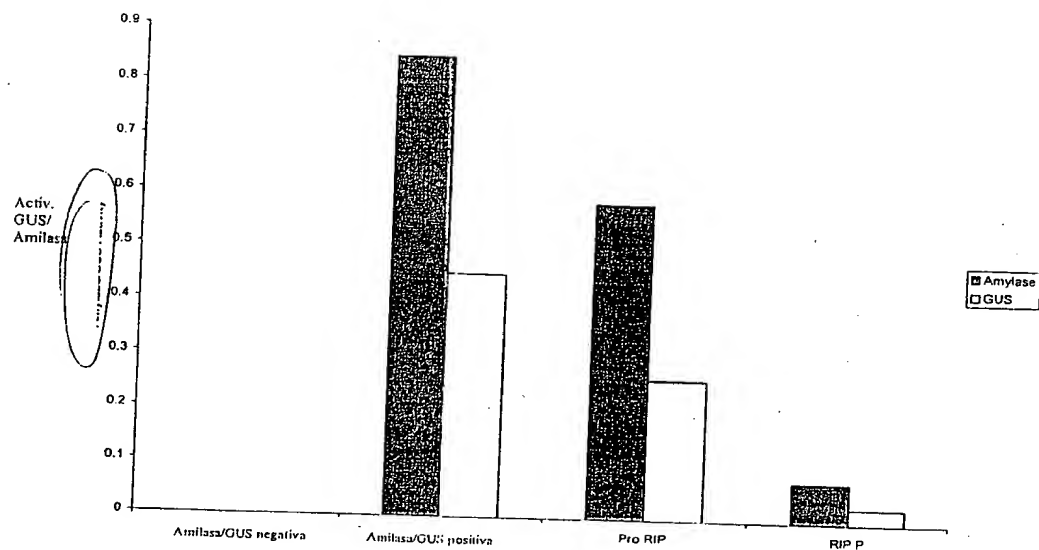


Figura 3.

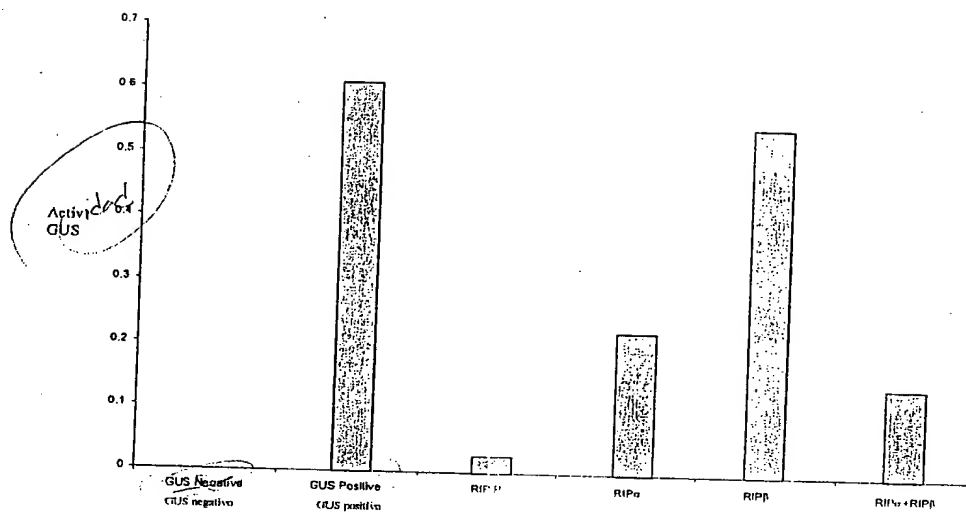


Figura 4.

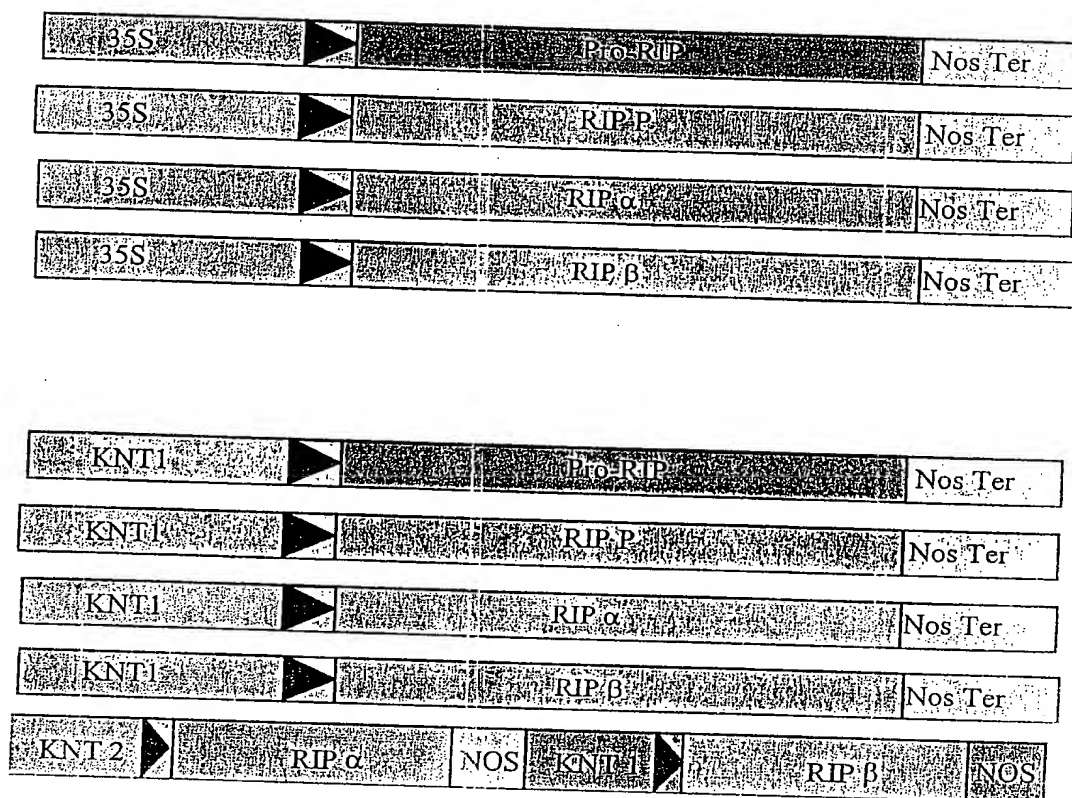


Figura 5.

* Dete en color para que se entienda en su totalidad

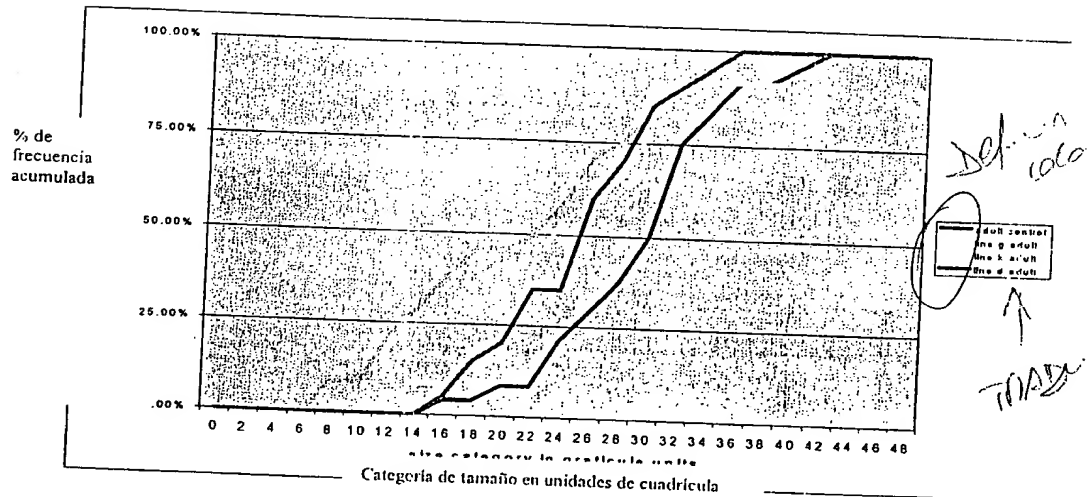


Figura 6.

* id) Le go es a Colores.....

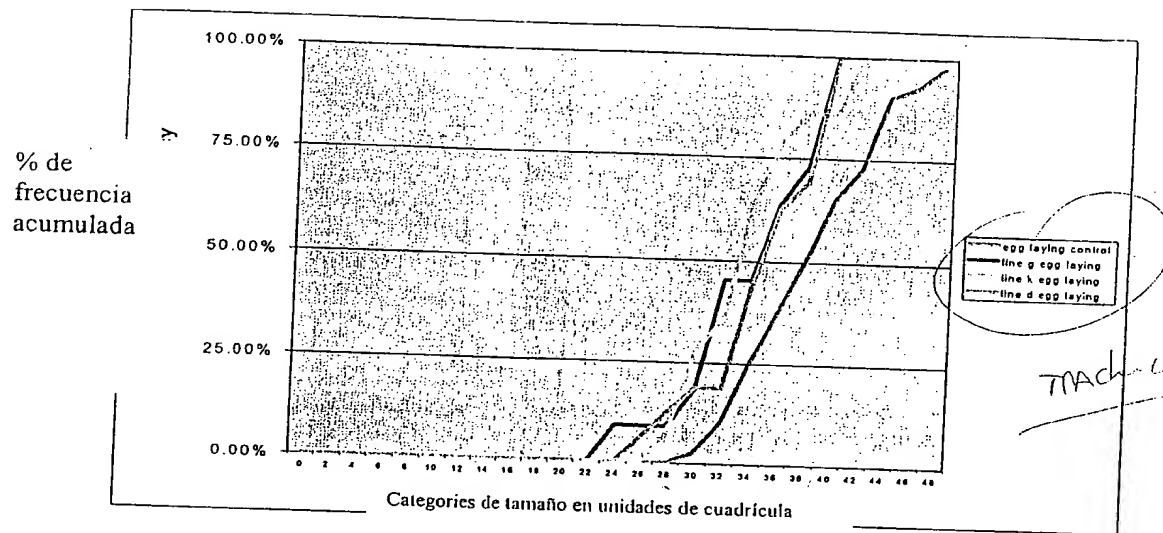


Figura 7

% de
frecuencia
acumulada

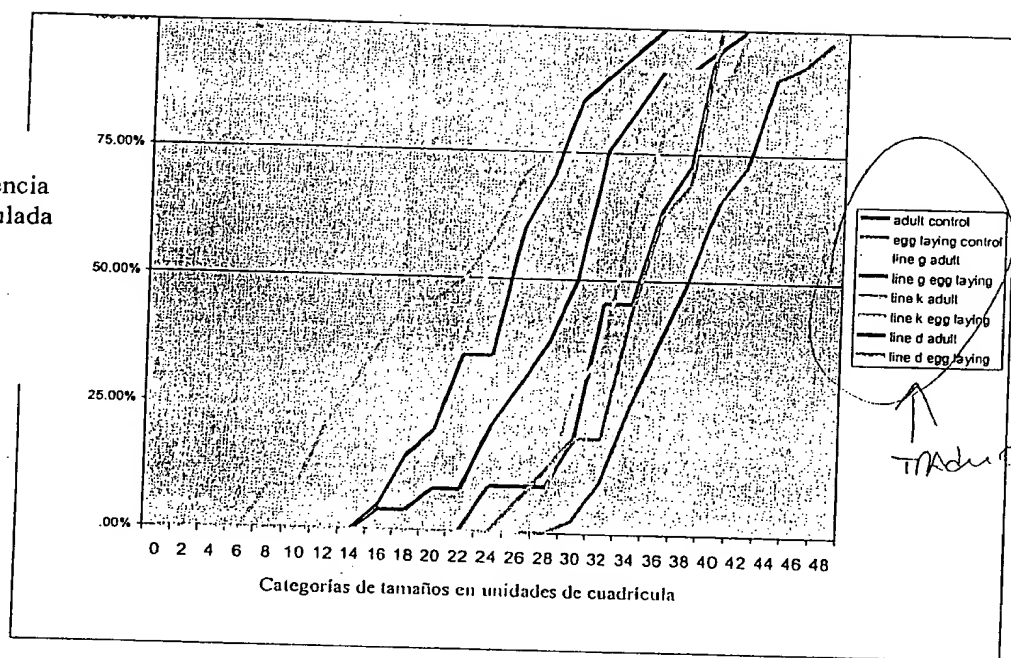


Figura 8.

x(fid) de los en color...

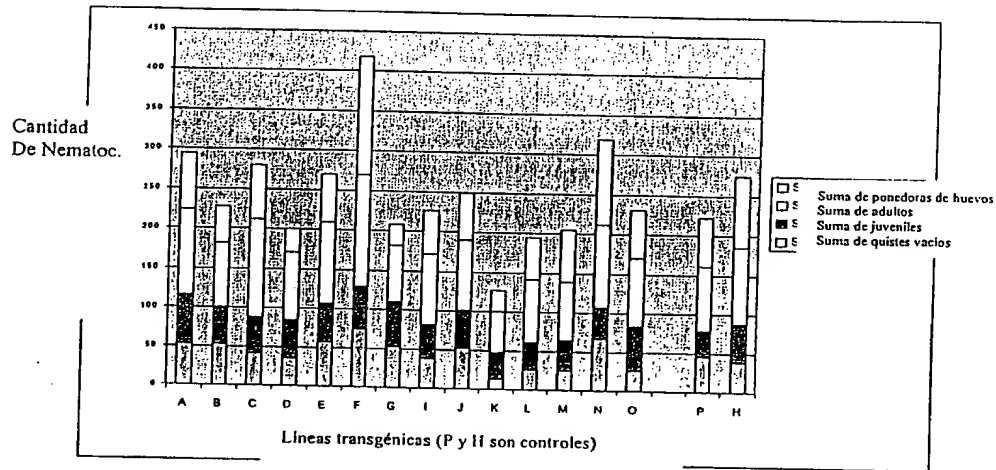


Figura 9.

Figura 10.

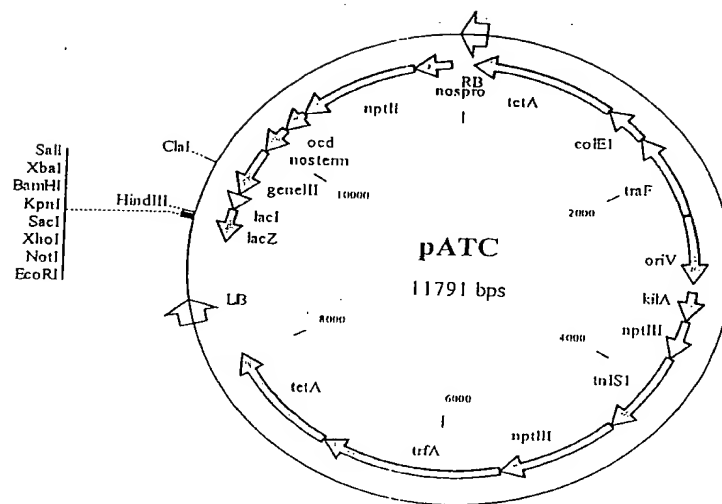


Figura 11.

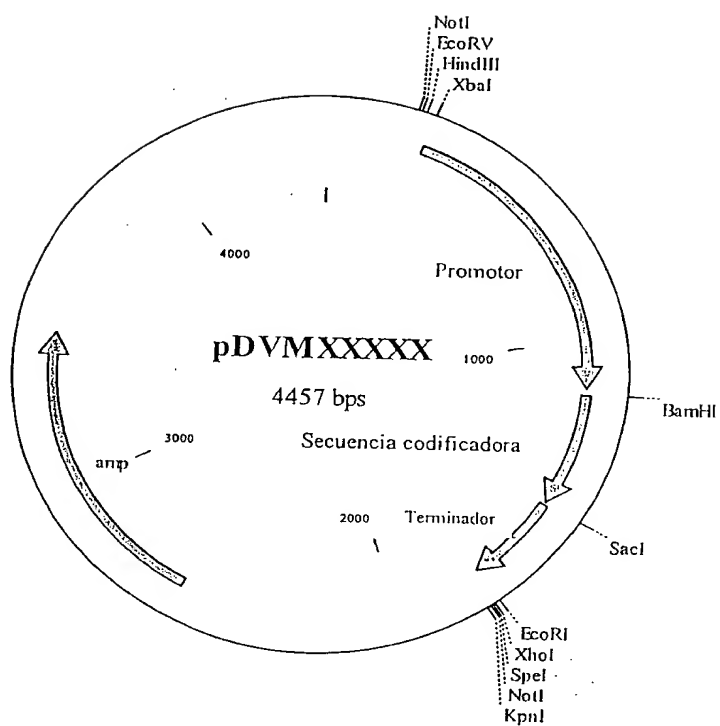
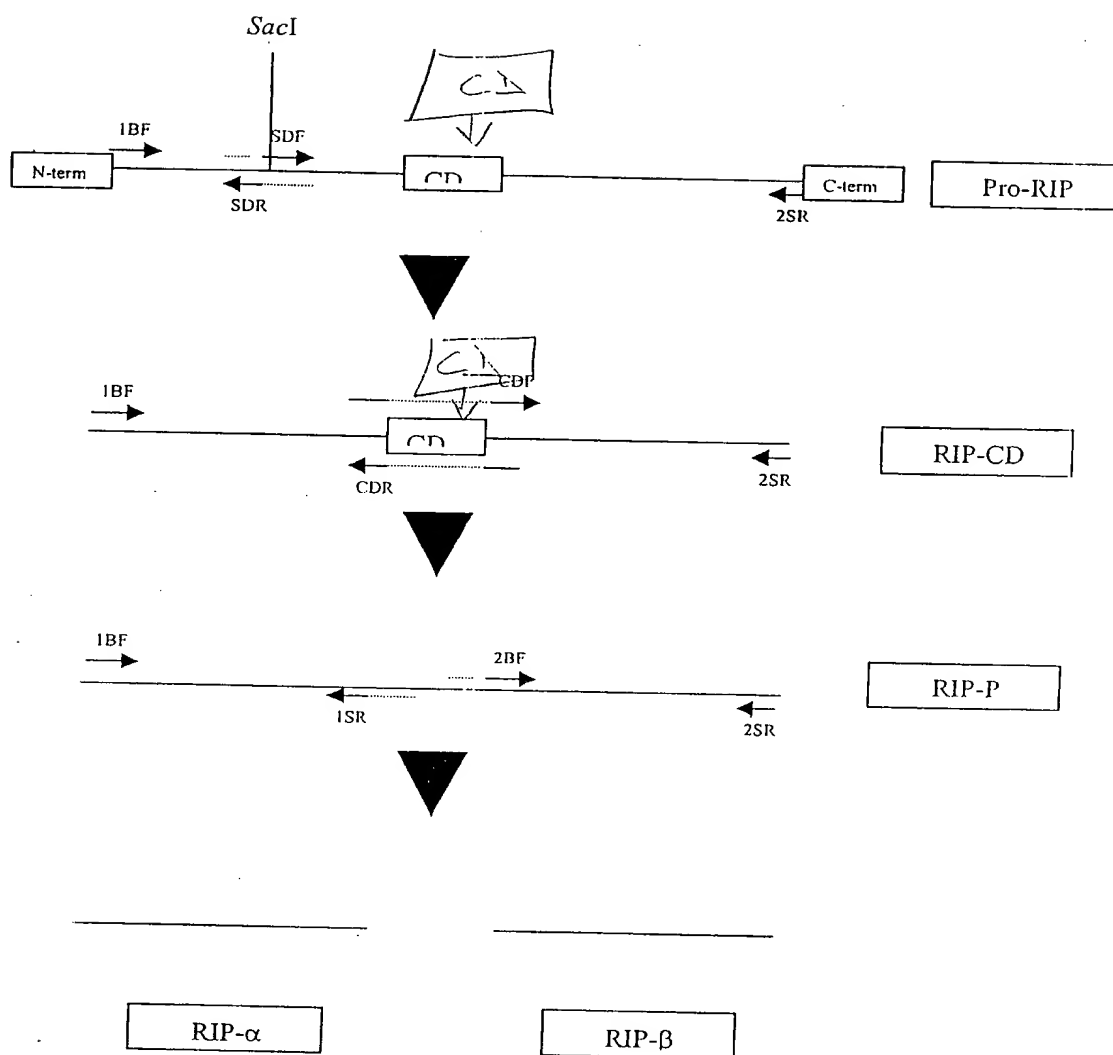


Figura 12.



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Advanced Technologies (Cambridge) Limited

<120> Sistema de muerte celular en plantas

<130> RD-ATC-28

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 909

<212> ADN

<213> *Zea mays*

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(48)

<223> Dominio N-terminal

<220>

<221> característica_misc

<222> (865)..(903)

<223> Dominio C-terminal

<220>

<221> característica_misc

<222> (484)..(558)

<223> Dominio central

<220>

<221> mutación

<222> (226)..(231)

<223> Secuencia que reemplaza el sitio SacI eliminado

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(3)

<223> Codón de inicio agregado mediante un cebador de PCR

<220>

<221> característica_misc

<222> (904)..(909)

<223> Codones de terminación agregados mediante un cebador de PCR

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(24)

<223> Sitio de unión para el cebador ProRIPBF

<220>

<221> característica_misc

<222> (205)..(249)

<223> Sitio de unión para el cebador RIPSDF

<220>

<221> característica_misc
 <222> Complemento((205)..(249))
 <223> Sitio de unión para el cebador RIFSDR

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> Complemento((880)..(909))
 <223> Sitio de unión para el cebador ProRIPSR

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (49)..(73)
 <223> Sitio de unión para el cebador RIP1BF

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> Complemento((837)..(864))
 <223> Sitio de unión para el cebador RIP2SR

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (463)..(579)
 <223> Sitio de unión para el cebador RIPCDF que abarca el dominio central

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> Complemento((463)..(579))
 <223> Sitio de unión para el cebador RIPCDF que abarca el dominio central

<400> 1
 atggccgaga taaccctaga gccgagtgat cttatggcgc aaacaaacaa aagaatagtg 60
 ccaaagtcca ctgaaatcct ccccgaggag gacgcgaact acccttacag cgccttcac 120
 gcgtcggtcc ggaaagacgt gatcaaacac tgcaccgacc ataaagggat cttccagccc 180
 gtgctgccac cggagaagaa ggtcccggag ctatggttct acacagaact gaaaactagg 240
 accagctcca tcacgctcgc catacgcagt gacaacctgt acctcggtgg cttcaggacc 300
 ccgggcgggg tgtggtggga gttcggcaag gacggcgaca cccacctcct cggcgacaac 360
 cccaggtggc tcggcttcgg cggcaggtac caggacctca tcggcaacaa ggtctcggag 420
 accgtcacca tgggcgcgcg cgaaatgacc agggccgtca acgacctggc gaagaagaag 480
 aagatggcga cactggagga ggaggaggtg aagatgcaga tgcagatgcc ggaggccgct 540
 gatctggcgg cggcggcagc ggctgaccca caggccgaca cgaagagcaa gctggtgaag 600
 ctggtggtca tgggtgtgca ggggctgcgg ttcaacaccg tgtcccgcac ggtggacgcg 660
 gggttcaaca gccagcacgg ggtgaccttg accgtgacgc aggggaagca ggtgcagaag 720
 tgggacagga tctccaaggc ggcttcgag tgggctgacc accccaccgc tgtgatcccc 780
 gacatgcaga agcttgcat caaggataag aacgaagcag cagggatcgt tgcgctcgtt 840
 aagaatcaaa ctactgccgc tgccgctact gctgccagtg ctgacaacga cgacgacgag 900
 gcctaataa 909

<210> 2
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(3)
 <223> Codón de inicio agregado mediante un cebador de PCR

 <220>

<221> mutación
 <222> (181)..(186)
 <223> Secuencia que reemplaza el sitio SacI eliminado

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (745)..(750)
 <223> Codones de terminación agregados mediante un cebador de PCR

<400> 2
 atgaaaagaa tagtgccaaa gtctactgaa atcttccccg tggaggacgc gaactaccct 60
 tacagcgct tcacgcgctc ggtccggaaa gacgtgatca aacactgcac cgaccataaa 120
 gggatcttcc agcccggtgt gccaccggag aagaagggtcc cggagctatg gttctacaca 180
 gaactgaaaa ctaggaccag ctccatcacg ctgccatac gcatggacaa cctgtacctc 240
 gtgggcttca ggacccccgg cgggggtgtgg tgggagttcg gcaaggacgg cgacaccac 300
 ctctcggcg acaaccccag gtggctcggc ttccggcggca ggtaccagga cctcatcggc 360
 aacaagggtc tggagaccgt caccatgggc cgcgccgaaa tgaccagggc cgtcaacgac 420
 ctggcgaaga agaagaaggc ggctgaccca caggccgaca cgaagagcaa gctggtgaag 480
 ctggtggtca tgggtgtcga ggggtgtcgg ttcaacaccg tgtcccgcac ggtggacgcg 540
 ggggttcaaca gccagcacgg ggtgacctg accgtgacgc aggggaagca ggtgcagaag 600
 tgggacagga tctccaaggc ggccttcgag tgggctgacc accccaccgc tgtgatcccc 660
 gacatgcaga agcttggcat caaggataag aacgaagcag cgaggatcgt tgcgctcggt 720
 aagaatcaaa ctactgccgc tgcctaataa 750

<210> 3
 <211> 444
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(3)
 <223> Codón de inicio agregado mediante un cebador de PCR

<220>
 <221> mutación
 <222> (181)..(186)
 <223> Secuencia que reemplaza el sitio SacI eliminado

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (439)..(444)
 <223> Codones de terminación agregados mediante un cebador de PCR

<400> 3
 atgaaaagaa tagtgccaaa gtctactgaa atcttccccg tggaggacgc gaactaccct 60
 tacagcgct tcacgcgctc ggtccggaaa gacgtgatca aacactgcac cgaccataaa 120
 gggatcttcc agcccggtgt gccaccggag aagaagggtcc cggagctatg gttctacaca 180
 gaactgaaaa ctaggaccag ctccatcacg ctgccatac gcatggacaa cctgtacctc 240
 gtgggcttca ggacccccgg cgggggtgtgg tgggagttcg gcaaggacgg cgacaccac 300
 ctctcggcg acaaccccag gtggctcggc ttccggcggca ggtaccagga cctcatcggc 360
 aacaagggtc tggagaccgt caccatgggc cgcgccgaaa tgaccagggc cgtcaacgac 420
 ctggcgaaga agaagaagta ataa 444

<210> 4
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Zea mays*

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(3)
 <223> Codón de inicio agregado mediante un cebador de PCR

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (349)..(354)
 <223> Codones de terminación agregados mediante un cebador de PCR

<400> 4
 atggcggtg acccacagggc cgacacgaag agcaagctgg tgaagctggt ggcatggtg 60
 tgcgaggggc tgcggttcaa caccgtgtcc cgcacgggtg acgcggggtt caacagccag 120
 cacgggggtga ccttgaccgt gacgcagggg aagcaggtgc agaagtggga caggatctcc 180
 aaggcggcct tcgagtgggc tgaccacccc accgctgtga tccccgacat gcagaagctt 240
 ggcatacagg ataagaacga agcagcgagg atcggttgcgc tcgttaagaa tcaaactact 300
 gccgtgcgc ctactgctgc cagtgtgtac aacgacgacg acgaggccta ataa 354

<210> 5
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador ProRIPBF

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

<400> 5
 actcgagtct agaggatcca tggccgagat aaccctagag ccg 43

<210> 6
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador ProRIPSR

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

<400> 6
 gactagtgtc gacgagctct tattaggcct cgtcgtcgtc gttgtcagc 49

<210> 7
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIP1BF

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

 <400> 7
 gctcgagtct agaggatcca tgaaaagaat agtgccaaag ttcactg 47

 <210> 8
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIP2SR

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

 <400> 8
 gactagtgtc gacgagctct tattaggcag cggcagtagt ttgattctta acg 53

 <210> 9
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIP1SR

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

 <400> 9
 aactagtgtc gacgagctct tattacttct tcttcttcgc caggtcggtg acg 53

 <210> 10
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIP2BF

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(19)
 <223> Sitios de restricción introducidos

 <400> 10
 actcgagtct agaggatcca tggcggctga cccacaggcc gacacgaaga g 51

 <210> 11

<211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIPCDF

 <400> 11
 gacctggcga agaagaagaa ggcggtgac ccacaggccg ac 42

 <210> 12
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIPCDR

 <400> 12
 gtcggcctgt gggtcagccg ccttcttctt cttcgccagg tc 42

 <210> 13
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIPSDF

 <220>
 <221> mutación
 <222> (22)..(27)
 <223> Nucleótidos modificados para eliminar el sitio SacI

 <400> 13
 ccggagctat ggttctacac agaactgaaa actaggacca gctcc 45

 <210> 14
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador RIPS DR

 <220>
 <221> mutación
 <222> (19)..(24)
 <223> Nucleótidos modificados para eliminar el sitio SacI

 <400> 14
 ggagctggtc ctagtcttca gttctgtgta gaaccatagc tccgg 45

 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial



<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador SUB21

<400> 15

ctcttgcttg aattcggact a

21

<210> 16

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador SUB25

<400> 16

tagtccgaat tcaagcaaga gcaca

25

<210> 17

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador LDT15

<400> 17

gacagaagcg gatccttttt tttttttttt

30

<210> 18

<211> 381

<212> ADN

<213> *Nicotiana tabacum*

<400> 18

tctagaaaagc ttatctaaac aaagttttaa attcatttct taaacgtcca ttacaatgta 60
atataactta gtcgtctcaa ttaaaccatt aatgtgaaat ataaatcaaa aaaagccaaa 120
gggcggtggg acggcgccaa tcatttgctc tagtccactc aaataaggcc catggtcggc 180
aaaaccaaac acaaaatgtg ttatttttaa ttttttcctc ttttattgtt aaagttgcaa 240
aatgtgttat ttttggttaag accctatgga tatataaaga caggttatgt gaaacttgga 300
aaaccatcaa gttttaagca aaacctctt aagaacttaa attgagcttc ttttggggca 360
tttttctagt gagaaggatc c 381

